



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO- PRPPG
NÚCLEO DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA –Biotec
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBiotec**

JOCÉLIA DO CARMO PINTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore**

**PARNAÍBA
2018**

JOCÉLIA DO CARMO PINTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBiotec, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Química e Bioquímica aplicada à Biotecnologia

Orientador: Prof^º. Dr^ª Ivanilza Moreira de Andrade

PARNAÍBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

P659e Pinto, Jocélia do Carmo.
Estudo fitoquímico e atividade biológica de folhas de *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore [manuscrito] / Jocélia do Carmo Pinto. – 2018.
84 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Ivanilza Moreira de Andrade

1. ABTS. 2. Atividade citotóxica. 3. Atividade hemolítica. 4. Carnaúba. 5. Cera epicuticular. 6. Folhas. 7. FTIR.

CDD: 661

JOCÉLIA DO CARMO PINTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FOLHAS DE
Copernicia prunifera (Mill.) H.E. Moore**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 06/04/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a: Ivanilza Moreira de Andrade
Universidade Federal do Piauí (Orientador)



Prof.^a. Dr.^a. Leiz Maria Costa Veras
Universidade Federal do Piauí (membro interno)



Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Betânia da Silva Andrade
Universidade Estadual Vale do Acaraú (membro externo)

*Dedico,
À minha mãe Genilde Fernandes e a minha avó
Maria Fernandes pelo amor incondicional,
incentivo e compreensão.*

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todos os dias da minha vida, por estar sempre comigo e por cuidar tão bem das pessoas que amo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBiotec, pela oportunidade da realização do curso.

À CAPES, pelo benefício concedido e pelo apoio.

À minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a **Ivanilza Moreira de Andrade**, pela orientação, pelos conselhos, pela paciência e excelência em ensinar.

À Prof.^a Dr.^a **Lúcia Betânia da Silva Andrade**, que me acolheu e me ajudou quando precisei no início de tudo, obrigado pelos ensinamentos.

Ao **Seu Lívio** de Caxingó, pelas histórias e pela gentileza em ajudar.

Ao Laboratório Células e Moléculas por todas as atividades realizadas e amizades construídas.

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia - Biotec e equipe pelo apoio e ajuda quando mais precisei, para a realização das minhas atividades, em especial à **Leiz Maria, Alyne Rodrigues e Erika Oliveira**.

À **Maria de Fátima Barroso e Ana Carvalho** do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), e ao professor **Peter Eaton** da Universidade do Porto (UP), pelos testes e pelas imagens.

À **Maria Francilene Souza Silva e a Cláudia do Ó Pessoa**, do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental de Fortaleza pela realização dos testes.

Aos maiores incentivadores dos meus sonhos, minha mãe, **Genilde Fernandes do Carmo**, minha avó, **Maria Fernandes do Carmo**, aos meus tios, **Francisco Fernandes do Carmo, Valber Fernandes do Carmo**, minha tia **Geilde Fernandes do Carmo**, minha prima irmã **Jucielle Fernandes do Carmo** e minha irmã **Jordânia do Carmo Pinto**, pelas orações, pelo apoio, pelos conselhos, pelo amor, pela confiança, obrigada por tudo família, amo vocês!

Ao meu grande amigo Prof. Dr. **Joilson Ramos de Jesus**, quem mais me ajudou durante a minha caminhada, pela amizade, pela paciência, pelos conselhos, pela disposição em ajudar e ensinar sempre que preciso, sem ele, algumas coisas não seriam possíveis, eternamente grata!

À minha amiga e companheira de jornada **Nábila Evelyn Martins**, por compartilhar das alegrias, das tristezas, enfim por todo apoio e incentivo, obrigada Nabinha!

Aos meus amigos irmãos **Amanda Lima, José Carlos, Maria Audicea, Bruna Suellen, Mirelle Martins e Line Monteiro** pela amizade, pelas visitas, pelas alegrias, pelo incentivo, pelos conselhos, mesmo que distantes se fizeram válidos e foram muito importantes nessa jornada, obrigada por tudo minha gente!

À minha amiga e vizinha de Bacabal, **Eliziane Carneiro**, pelo incentivo, carinho, pelos conselhos, pelo companheirismo, muito obrigada Lilica!

As minhas amigas **Geisiane Castro, Juélina dos Santos e Roberta Lilian** por todo cuidado, companheirismo e amizade!

Enfim, a todos os familiares, aos velhos e novos amigos, aos que não estão mais presentes nesse mundo, que sempre me deram força e que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Muito grata por tudo e por todos vocês que fazem parte da minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. APRESENTAÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	18
2.1 Arecaceae.....	18
2.2 <i>Copernicia prunifera</i> (Mill.) H.E. Moore.....	19
2.3 Cera epicuticular	24
2.4 Atividade Biológica de <i>Copernicia prunifera</i> (Mill.) H. E. Moore.....	27
3. REFERÊNCIAS	28
4. CAPITULO 1 - ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DE EXTRATO AQUOSO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE <i>Copernicia prunifera</i> (Mill.) H. E. Moore.....	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
4.1 INTRODUÇÃO.....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.2.1 Material Vegetal	37
4.2.2 Obtenção de Extratos	38
4.2.3 Análise Fitoquímica e Físico-química	38
4.2.4 Fenóis Totais.....	39
4.2.5 Atividade Antioxidante.....	39
4.2.6 Análise de Citotoxicidade.....	40
4.2.7 Atividade Hemolítica.....	41
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.3.1 Análise Fitoquímica e Físico-química	42
4.3.2 Fenóis Totais e Atividade Antioxidante.....	47
4.3.3 Análise de Citotoxicidade	48
4.3.4 Atividade Hemolítica.....	49
4.4 CONCLUSÃO.....	50
4.5 REFERÊNCIAS	51
5. CAPITULO 2 - INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES NA REMOÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE <i>Copernicia prunifera</i> (Mill.) H.E. Moore E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HEMOLÍTICA	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
5.1 INTRODUÇÃO.....	59
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60

5.2.1	Obtenção e preparo do material vegetal.....	60
5.2.2	Métodos de remoção da cera epicuticular (CE).....	60
5.2.3	Preparo, obtenção e rendimento dos extratos	61
5.2.4	Fitoquímica	61
5.2.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	62
5.2.6	Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+	62
5.2.7	Atividade Hemolítica	63
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.3.1	Métodos de remoção da cera epicuticular.....	63
5.3.2	Rendimento dos extratos.....	67
5.3.3	Fitoquímica	69
5.3.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	70
5.3.5	Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+	74
5.3.6	Atividade Hemolítica	75
5.4	CONCLUSÃO.....	78
5.5	REFERÊNCIAS	79
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS•+	(2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))
CE	Cera epicuticular
CEFJ	Cera epicuticular de folhas jovens
CEFM	Cera epicuticular de folhas maduras
EAFJ	Extrato aquoso da cera epicuticular de folhas jovens
EAFM	Extrato aquoso da cera epicuticular de folhas maduras
EAFJC	Extrato aquoso de folhas jovens tratadas com clorofórmio
EAFMC	Extrato aquoso de folhas maduras tratadas com clorofórmio
EAFJH	Extrato aquoso de folhas jovens tratadas com hexano
EAFMH	Extrato aquoso de folhas maduras tratadas com hexano
EEFJC	Extrato etanólico de folhas jovens tratadas com clorofórmio
EEFMC	Extrato etanólico de folhas maduras tratadas com clorofórmio
EEFJH	Extrato etanólico de folhas jovens tratadas com hexano
EEFMH	Extrato etanólico de folhas maduras tratadas com hexano
EMFJH	Extrato metanólico de folhas jovens tratadas com clorofórmio
EMFMC	Extrato metanólico de folhas maduras tratadas com clorofórmio
EMFJH	Extrato metanólico de folhas jovens tratadas com hexano
EMFMH	Extrato metanólico de folhas maduras tratadas com hexano
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

Figura 1. *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore. . A. Hábito; B. Caule; C. Folhas jovens e maduras; D. Frutos.....22

Figura 2. Etapas do processo de obtenção do pó cerífero da cera epicuticular de folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Mill.) H.E. Moore.....26

CAPITULO 1 - ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DE EXTRATO AQUOSO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore

Figura 1. Espectro de absorção na região do infravermelho (FTI-ATR) da cera epicuticular (CEFJ e CEFM), e dos extratos aquosos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore.....44

Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir dos extratos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e extrato de cera epicuticular de folhas maduras (EAFM) de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore e padrões de ácidos fenólicos...46

Figura 3. Atividade hemolítica de extratos aquosos de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *Copernicia. prunifera* (Mill.) H.E. Moore.50

CAPITULO 2 - INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES NA REMOÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HEMOLÍTICA

Figura 1. Microscopia Eletrônica de Superfície (SEM) de folhas jovens (olho) de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore.....65

Figura 2. Microscopia Eletrônica de Superfície (SEM) de folhas maduras (palha) de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore..	66
Figura 3. Rendimento percentual bruto dos extratos de folhas jovens e maduras de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.....	68
Figura 4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração aquosa das folhas jovens e maduras de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.	71
Figura 5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração etanólica das folhas jovens e maduras de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.	73
Figura 6. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração metanólica das folhas jovens e maduras de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.	74
Figura 7. Atividade hemolítica de extrações aquosas de folhas de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.	76
Figura 8. Atividade hemolítica de extrações etanólicas de folhas de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.....	77
Figura 9. Atividade hemolítica de extrações metanólicas de folhas de <i>C. prunifera</i> (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DE EXTRATOS AQUOSOS DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore

Tabela 1. Metabólitos secundários em extratos aquosos da cera epicuticular de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore obtidos das folhas jovens (EAFJ) e folhas maduras (EAFM).....43

Tabela 2. Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante pelo método ABTS +• de extratos aquosos de folhas jovens (EAFJ) e folhas maduras (EAFM) de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore.....47

Tabela 3. Atividade citotóxica *in vitro* de extratos aquosos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore contra linhagens de células tumorais.....48

INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES NA REMOÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HEMOLÍTICA

Tabela 1. pH dos extratos de folhas jovens e maduras de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore, tratadas com clorofórmio e hexano.69

Tabela 2. Fitoquímica qualitativa de extratos das folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore. 70

Tabela 3. Atividade antioxidante pelo método ABTS de diferentes extrações de folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.75

RESUMO

Copernicia prunifera (Mill.) H.E. Moore é uma palmeira nativa do Brasil que agrega valores tanto para a economia local quanto para a economia do país. Dentre as várias partes da planta, a cera epicuticular que recobre a superfície das folhas é a principal matéria prima utilizada na fabricação de cera, com utilização em diversos setores industriais. Embora de ampla utilização, ainda são escassos estudos fitoquímicos e biológicos sobre a espécie. Objetivou-se comparar dois tratamentos de remoção da cera epicuticular (CE), por clorofórmio (CHCl_3) e por hexano (C_6H_{12}), além de caracterizar a fitoquímica e avaliar a atividade biológica de extratos alcoólicos e aquosos obtidos da folha e da cera epicuticular de folhas jovens (olho) e maduras (palha) de *C. prunifera*. As amostras foram coletadas no município de Caxingó, Piauí, Brasil. Para a caracterização fitoquímica foram utilizados testes qualitativos (fenóis, taninos, saponinas, açúcar redutor, ácidos orgânicos, polissacarídeos, alcalóides e flavonóides) e quantitativos (rendimento e fenólicos totais). Para a identificação dos principais agrupamentos químicos das amostras foi feita a Eletroquímica e a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR. A avaliação da capacidade antioxidante foi determinada pelo método 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) - ABTS + •. O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos da cera epicuticular foi verificado em quatro linhagens tumorais e a análise da atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos. A observação da eficácia dos dois tratamentos foi realizada utilizando microscopia eletrônica de superfície (SEM). O rendimento percentual bruto (RPB) do extrato aquoso da cera epicuticular das folhas maduras (EAFM) foi maior (1,9%) em relação ao rendimento do extrato aquoso da cera epicuticular das folhas jovens EAFJ (1,5%). As folhas tratadas com clorofórmio tiveram maior RPB do que as folhas tratadas com hexano. O potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos da CE foram levemente ácidos, 5,7 (EAFJ) e 6,0 (EAFM), assim como o extrato etanólico (4,7) e metanólico (5,9) de folhas tratadas com clorofórmio, enquanto os demais extratos de folhas de ambos os tratamentos apresentaram pH neutro. Taninos condensados, saponinas e açúcares redutores alcalóides e flavonóis foram detectados nos extratos de folha e de cera epicuticular. A análise de FTIR revelou a presença de bandas associadas a esses metabólitos. O conteúdo de fenólicos totais dos extratos aquosos da cera foi menor no EAFJ ($56,48 \pm 21,91$ mg EAG/g de extrato) do que o EAFM ($158,52 \pm 39,27$ mg EAG/g de extrato). A atividade antioxidante (AA) foi de $34,9 \pm 4,8$ μg e $100,3 \pm 15,2$ μg para EAFJ e EAFM, respectivamente. Os extratos (aquoso, etanólico e metanólico) de folhas maduras tratadas com clorofórmio tiveram AA maior quando comparadas com folhas maduras tratadas com hexano. As folhas jovens tratadas com hexano apresentaram AA mais eficiente. Os extratos aquosos da cera epicuticular apresentaram citotoxicidade para a linhagem de glioblastoma (SF-295), enquanto os extratos de cera e de folhas tratadas com hexano apresentaram baixa toxicidade para eritrócitos humanos. Os resultados obtidos demonstram que além das aplicações industriais, a cera epicuticular e a folhas de *C. prunifera* apresentam grande potencial biológico.

Palavras-Chave: ABTS. Atividade citotóxica. Atividade hemolítica. Carnaúba. Cera epicuticular. Folhas. FTIR.

ABSTRACT

Copernicia prunifera (Mill.) H. E. Moore is a native palm tree from Brazil that adds values both for the local economy and country's economy. Among the various parts of the plant, the epicuticular wax that covers the surface of the leaves is the main raw material used in the manufacture of wax, used in various industrial sectors. Although widely used, there are still few phytochemical and biological studies about the species. The objective of this study was to compare two treatments for the removal of epicuticular wax (EC), chloroform (CHCl₃) and hexane (C₆H₁₂), and characterize phytochemistry and evaluate the biological activity of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of leaves and epicuticular wax, both without treatment and treatment of *C. prunifera*. The samples were collected in the city of Caxingó, Piauí, Brazil. For the phytochemical characterization were used qualitative tests (phenols, tannins, saponins, reducing sugar, organic acids, polysaccharides, alkaloids and flavonoids) and quantitative (yield and total). For the identification of the main chemical groupings of the samples, the electrochemistry and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were made. The evaluation of the antioxidant capacity was determined by the 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) - ABTS + • method. The in vitro cytotoxic potential of the epicuticular wax extracts was verified in four tumor lines and the biocompatibility was evaluated by analyzing the hemolytic activity on human erythrocytes. The efficacy of the two treatments was observed using surface electron microscopy (SEM). The crude percentage yield (RPB) of the aqueous extract of the mature leaves epicuticular wax (EAFM) was higher (1.9%) than the aqueous extract of the epicuticular wax of the young leaves EAFJ (1.5%). The leaves treated with chloroform had higher RPB than leaves treated with hexane. The hydrogenation potential (pH) of EC extracts were slightly acidic, 5.7 (EAFJ) and 6.0 (EAFM), as well as ethanolic (4.7) and methanolic (5.9) extracts of green leaves treated with chloroform, however all other extracts of the leaves of both treatments presented neutral pH. Condensed tannins, saponins and alkaline reducing sugars and flavonols were detected in leaf extracts and epicuticular wax. FTIR analysis revealed the presence of bands associated with these metabolites. The total phenolic content of aqueous extracts of wax was lower in EAFJ (56.48 ± 21.91 mg EAG / g extract) than EAFM (158.52 ± 39.27 mg EAG / g extract). The antioxidant activity (AA) was 34.9 ± 4.8 µg and 100.3 ± 15.2 µg for EAFJ and EAFM, respectively. The extractions (aqueous, ethanolic and methanolic) of mature leaves treated with chloroform had higher AA when compared to mature leaves treated with hexane. Young leaves treated with hexane showed more efficient. Aqueous extracts of epicuticular wax showed cytotoxicity to the glioblastoma line (SF-295), while extracts of wax and leaves treated with hexane showed low toxicity to human erythrocytes. The results obtained show that in addition to the industrial applications, the epicuticular wax and the leaves of *C. prunifera* present great biological potential.

Keywords: ABTS. Cytotoxic activity. Hemolytic activity. Epicuticular wax. Carnauba. Leaves. FTIR.

1. APRESENTAÇÃO

As plantas desempenham papel importante na descoberta de novos medicamentos, com base nas suas propriedades naturais de atividade seletiva contra alvos relacionados a diversas enfermidades (RUFINO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). Aproximadamente 80% das pessoas nos países em desenvolvimento ainda dependem da medicina tradicional, pois utilizam principalmente espécies vegetais e animais para seus cuidados primários de saúde (RUAS, 2014).

Os metabólitos secundários são compostos originários do metabolismo vegetal que auxiliam na manutenção, equilíbrio, sobrevivência e defesa da planta, alguns deles com grande valor terapêutico. Suas propriedades farmacológicas são utilizadas como modelos estruturais para a síntese de novas moléculas que auxiliam na prevenção e tratamento de diversas patologias, como por exemplo, câncer, doenças cardiovasculares, neurológicas e metabólicas (NEWMAN; CRAG, 2012; PEREIRA; DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012), representando dessa forma uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, de baixo custo e com menos efeitos colaterais (PRUDENTE; MOURA, 2013).

A família *Arecaceae* da qual pertence espécies vegetais conhecidas como palmeiras, apresentam grande importância econômica e ecológica pela exploração de seus recursos naturais, sendo também consideradas peças-chaves na estrutura e funcionamento de vários ecossistemas (LIEBERMAN et al., 1985; RODRIGUES, 2004; SILVA, 2012; PEREIRA, et al., 2014; CAXAMBU et al., 2015; SOUSA et al., 2015; RAGUSANETO, 2016). As areáceas difundem-se entre regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes e apresentam cerca de 2.600 espécies distribuídas em mais de 200 gêneros (CAXAMBU et al., 2015; SILVA et al., 2015). Apesar da importância, essa família carece de mais estudos fitoquímicos e atividades biológicas das espécies.

Copernicia prunifera (Mill.) H.E. Moore, conhecida como carnaúba, é uma das espécies nativas pertencente a *Arecaceae*, que ocorre no Brasil. Apresenta grande importância econômica no mercado interno e externo (ALVES; COELHO, 2006) pela exploração econômica da cera epicuticular de suas folhas, utilizada na fabricação de cera. Esta possui grande aproveitamento em indústrias de diversos setores, como alimentício (revestimento de frutas, produção de chicletes e chocolates), químico, têxtil, farmacêutico, de cosmética (formulações de batons, cremes e emulsões), além da

fabricação de papeis e embalagens, pinturas e modelagens (RODRIGUES, 2004; FERREIRA, 2009; BEZERRA, 2013; SOUSA et al., 2015).

A literatura sobre a carnaúba trata principalmente sobre etnobotânica (LEITE; ARINHO, 2014; SOUSA et al., 2015), e embora diversas partes da planta sejam citadas nestes trabalhos para várias finalidades, estudos sobre sua utilização na prevenção e tratamento de doenças ainda são poucos explorados, a exemplo da cera epicuticular da folha. Até o momento são poucos os registros sobre estudos fitoquímicos e atividade biológica utilizando extratos de folhas e de cera epicuticular (AYRES et al., 2008; RUFINO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015; DE ALMEIDA et al., 2016).

Diante do exposto, objetivou-se realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade citotóxica e hemolítica de extratos de folhas e cera epicuticular de *C. prunifera*, e comparar dois métodos de tratamentos de remoção da cera epicuticular (CE), por clorofórmio (CHCl_3) e hexano (C_6H_{12}). E como objetivos específicos: caracterizar qualitativamente os metabólitos secundários e quantificar os teores de fenólicos totais dos extratos da cera epicuticular; caracterizar qualitativamente os metabólitos secundários de extratos da folha; avaliar a atividade antioxidante dos extratos da cera epicuticular pelo método do ABTS•+; avaliar a atividade antioxidante dos extratos da folha pelo método do ABTS•+; verificar o potencial citotóxico dos extratos da cera epicuticular, frente às linhagens tumorais: HCT-116 (côlon - humano), SF295 (Glioblastoma), PC3 (Próstata) e HL60 (Leucêmica); avaliar a atividade hemolítica dos extratos da cera epicuticular sobre eritrócitos humanos; e avaliar atividade hemolítica dos extratos das folhas sobre eritrócitos humanos.

O presente estudo está estruturado em três seções: pré-textual, textual (apresentação, fundamentação teórica e referências, seguindo as normas da ABNT vigente), seguidos dos manuscritos intitulados: “Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica e hemolítica de extratos aquosos da cera epicuticular de folhas de *Copernicia Prunifera* (Mill.) H.E. Moore”, e “Influência dos solventes na remoção da cera epicuticular de folhas de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore e avaliação da atividade antioxidante e hemolítica”.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Arecaceae

Arecaceae Schultz Sch. apresenta cerca de 2.600 espécies distribuídas em mais de 200 gêneros, difundidas em regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes (CAXAMBU et al., 2015; SILVA et al., 2015). Para o Brasil estão registrados 37 gêneros nativos e 296 espécies características de florestas tropicais, presentes em praticamente todos os tipos de formações vegetais (SILVA et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2018).

As palmeiras geralmente vivem em densas populações e variam tanto em forma como em tamanho. A presença de características botânicas peculiares contribuiu para que se tornassem um grupo de grande destaque entre as angiospermas. Sua presença em alguns habitats é determinante para a caracterização do ambiente, sendo consideradas peças-chaves em vários ecossistemas (SILVA, 2012; PEREIRA, et al., 2014; CAXAMBU et al., 2015; SOUSA et al., 2015; RAGUSA-NETO, 2016).

As Arecáceas são monoicas ou dioicas com raízes aéreas ou subterrâneas e estirpes que podem ser cespitosos ou solitários, aéreos ou subterrâneos e raramente escandentes. Suas raízes podem ser aéreas ou subterrâneas. Quando aéreo pode apresentar-se liso ou com espinhos, com folhas distribuídas no ápice de seu estipe. As folhas podem ser simples, em forma de leque ou pinatipartidas, com segmentos foliares paralelinérveos ou palminérveos, apresentando bainha aberta ou fechada, de pecíolo longo ou curto. As inflorescências apresentam-se em forma de espiga, cachos ou racemos, podendo ser intrafoliares ou interfoliares. As flores são geralmente sésses e trímeras. Os frutos apresentam tamanhos variados, com pericarpo liso ou com espinhos, carnosos e/ou fibrosos, e os endocarpos geralmente são duros, contendo uma ou mais semente em seu interior (LORENZI et al., 2010; SILVA et al., 2012; SILVA, 2012; PEREIRA et al., 2014).

A propagação das palmeiras se dá principalmente por intermédio de sementes, que apresentam germinação lenta, de baixa porcentagem e irregular, perdendo drasticamente a viabilidade quando sofrem desidratação (NOGUEIRA, 2009; QUEIROGA et al., 2013).

As palmeiras são economicamente importantes para diversas culturas, sendo amplamente utilizadas e exploradas comercialmente devido às matérias primas que

delas podem ser retiradas, sendo consideradas um dos recursos vegetais mais importantes (RODRIGUES, 2004).

Algumas espécies da família são utilizadas na alimentação por apresentarem em sua composição açúcares, proteínas e vitaminas, como *Cocos nucifera* L. (coqueiro) (CLEMENT et al., 2005); outras são fornecedoras de palmito, como *Euterpe edulis* Mart. (palmito-juçara); e outras utilizadas de forma extrativista, como *Attalea speciosa* Mart. ex. Spreng. (Babaçu-do-maranhão) (LORENZI et al., 2010).

Além do potencial alimentício existem espécies fornecedoras de fibras, dentre elas destacam-se *C. prunifera* (Carnaúba), *Attalea funifera* Mart. ex. Spreng. (Piaçava) e *Leopoldina piassaba* Wallace ex Archer (Piaçava), *Mauritia flexuosa* L. (Buriti), *Astrocaryum vulgare* Mart. (Tucum), *Desmoncus orthacanthos* Mart. (Titara) e *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. (Licuri) (SILVA, 2012).

Bactris gasipaes Kunth (Pupunha), *Elaeis guineensis* L. (Dendê), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart (Macaúba), *Orbignya phalerata* Mart. (Babaçu) e *Cocos nucifera* (Coqueiro) (RUFINO, 2007), são exemplos de espécies que apresentam potencial oleaginosa (CLEMENT et al., 2005; SILVA, 2012).

Algumas Arecaceas são bastante utilizadas na ornamentação, destacando-se os gêneros *Phoenix* spp. (Tamareiras), *Coccothrinax* Sarg., *Livistona* R. Br., *Pritchardia* Seem. & H. Wendl. ex. H. Wendl., *Sabal* Adans., *Schippia* (Palmeiras-de-leque), *Caryota* L. (Palmeiras-rabo-de-peixe) e *Roystonea* spp. (Palmeiras-reais ou imperiais) (SOUZA; LORENZI, 2008; SILVA, 2012).

Do ponto de vista biológico e químico da família, algumas espécies apresentam potencial antioxidante como *Orbignya phalerata* L. (Açaí) (BERNAUD; FUNCHAL, 2011), *Euterpe edulis* Mart. (Juçara) (LIMA et al., 2012). *C. prunifera* (Carnaúba) (OLIVEIRA et al., 2015), *Mauritia flexuosa* L. (Buriti) (SANDRI et al., 2017) e *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc (Guariroba) (COIMBRA, 2010). A maioria das espécies não possui atividade cianogênica (RODRIGUES, 2004) e em algumas podem estar presentes alcaloides, protocianidinas, flavonoides, saponinas, saponinas, éteres metílicos e triterpenos (LUBRANO et al., 1994; RODRIGUES, 2004).

2.2. *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore

Copernicia prunifera é uma das 24 espécies de *Copernicia*. A maioria das espécies (19) deste gênero é natural da ilha de Cuba, no Caribe, enquanto duas são

nativas da República Dominicana e Haiti (*C. berteriana* Becc. e *C. ekmanii* Burret, respectivamente). No território brasileiro, este gênero está representado por duas espécies nativas, *Copernicia alba* Morong ex Morong e *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore, a primeira encontrada na região Sul do Brasil e a segunda nas regiões Norte, Nordeste e Sul do país (DRANSFIELD et al., 2008; MASETTO et al., 2012).

A maioria das copernícias crescem em savanas abertas sob solos arenos-argilosos, enquanto algumas se desenvolvem próximas a manguezais, e outras preferem solos serpentinos que são ricos em magnésio e ferro, como é o caso da *C. cowellii* que cresce exclusivamente nesse tipo de solo (DRANSFIELD et al., 2008). Ainda algumas palmeiras podem se desenvolver, mesmo que de forma lenta, em ambientes de clima frio, no caso de *C. ekmanii* e *C. berteriana* (DRANSFIELD et al., 2008).

As palmeiras pertencentes a esse gênero são hermafroditas, geralmente solitárias e raramente agrupadas, apresentando crescimento lento. Os troncos apresentam cicatrizes devido às folhas que se desprendem e com a idade vão adquirindo aspecto mais liso. As folhas podem ser simples, palmadas ou costapalmadas, apresentando bainha fibrosa; os pecíolos podem ser longos, curtos ou mesmo ausentes, adaxialmente achatados e abaxialmente arredondados com espinhos muito resistentes em suas margens. A inflorescência é interfoliar, bastante ramificada, muitas vezes ultrapassando as folhas, apresentando pedúnculo estreito e alongado; as brácteas são tubulares e estreitas; as flores são compostas por três sépalas unidas por lóbulos; a corola é tubular com seis estames; o pólen é elipsoidal com assimetria discreta ou evidente. Os frutos são esféricos ou ovóides, geralmente desenvolvidos a partir de um único carpelo; apresentam epicarpo liso e mesocarpo ligeiramente carnosos, com fibras que se unem longitudinalmente e endocarpo moderadamente espesso. As sementes podem ser globosas ou ovóides (DRANSFIELD et al., 2008).

Copernicia prunifera, popularmente conhecida como carnaúba, tem esta palavra genérica originária da língua indígena tupi, que significa “árvore que arranha”, e faz referência à aparência do seu estipe (DE ANDRADE et al., 2008). Tem como sinônimos as palavras, carnaúba, carandaúba, carnaíba, carnaíba e carnaúva (ARAGÃO, 2007; NOGUEIRA, 2009). Também é conhecida como a “árvore da vida”, pois apresenta recursos naturais variados com inúmeras finalidades (AYRES et al., 2008; GOMES et al., 2009; NOGUEIRA, 2009; PEREIRA et al., 2014; SOUSA et al., 2015).

C. prunifera pode ser encontrada na África Equatorial, Colômbia, Ceilão, Equador e Tailândia (NOGUEIRA, 2009; LEITMAN et al., 2015). No Brasil, é registrada para o Norte (Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Centro-Oeste (Mato Grosso) (FLORA DO BRASIL 2018).

C. prunifera é uma planta xerófila que cresce com facilidade em qualquer região de clima tropical com temperaturas entre 26° a 35° C, consegue se adaptar ao clima seco e quente, e ainda pode se desenvolver em solos argilosos, arenosos e alagadiços, várzeas e margens de rios, são bastante resistentes a salinidade (NOGUEIRA, 2009). As raízes são profundas e finas com crescimento radial, do tipo fasciculadas ou adventícias, crescendo amplamente pelo solo. Apresentam sabor suavemente alcalino e solubilidade em água (CARVALHO, 1942).

Trata-se de uma palmeira facilmente distinguível por seu porte. Quando adulta pode atingir de 15 a 20 m de altura e 15 a 25 cm de diâmetro e em condições favoráveis ao seu crescimento pode crescer 30 cm por ano, atingindo a primeira floração (maturidade botânica), entre os 12 e 15 anos de idade (BEZERRA, 2013; RODRIGUES et al., 2013; ROCHA et al., 2015).

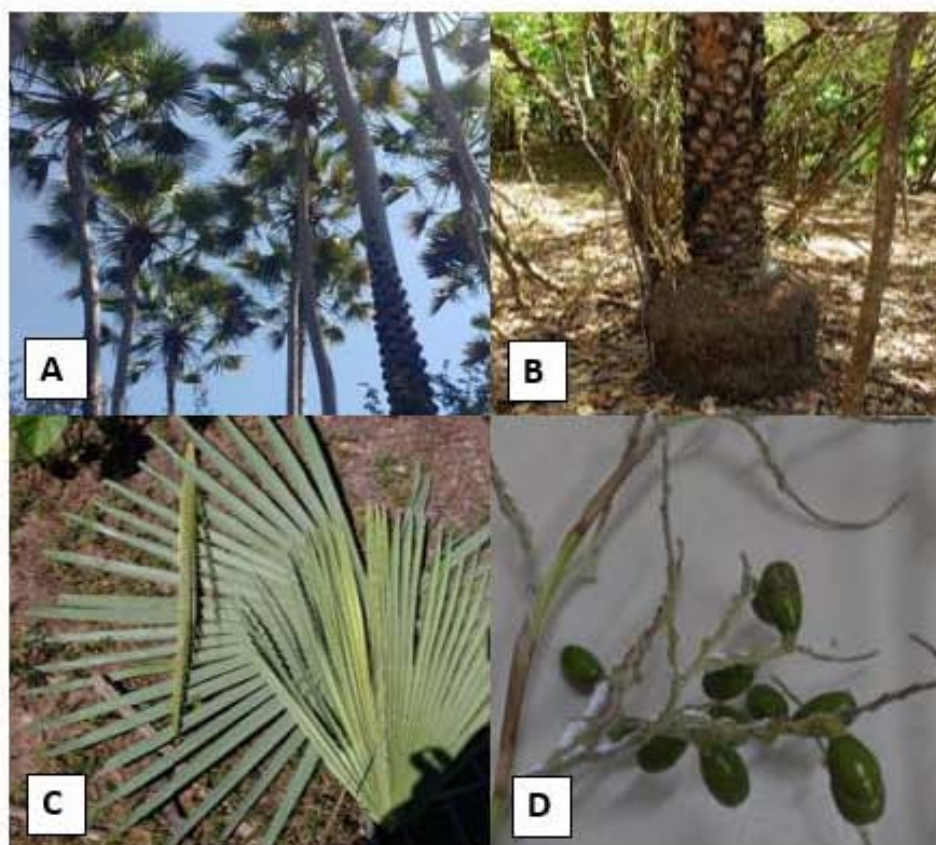
As folhas são palmadas de coloração verde-clara, com diâmetro variando de 0,6 a 1,0 metro; o pecíolo ou “talo”, como é comumente chamado, pode atingir até 1,5 metros de comprimento; é recoberto por espinhos muito resistentes que se aderem principalmente na borda e lembram a forma de “unha de gato” (ROCHA et al., 2015). Uma planta adulta produz por ano entre 46 a 60 folhas maduras (palha) e de 4 a 12 folhas jovens (olho) e a altura da palmeira é acompanhada do aumento do comprimento dos pecíolos (FERREIRA, 2009; TAVEIRA et al., 2014). Com o passar dos anos, as folhas se desprendem por completo do caule ficando apenas marcas discretas e este adquire forma cilíndrica e lisa, daí a denominação genérica de carnaúba “lavada” (HENDERSON et al., 1995).

As flores são extremamente pequenas e amareladas, se apresentam em grande quantidade dispostas em cachos ou espádice, que podem atingir até 2 m de comprimento; são monoicas e protegidas por uma espata membranácea, seca e tubulosa; apresentam ovário relativamente espesso e ligeiramente piloso; estigma trilobado com estames em anel carnoso 6-dentado, com dentes de 2 cm ovoide-globosa, glabra,

luzidia, que quando jovem este adquire coloração amarelo-esverdeada (BEZERRA, 2013).

Os frutos, também chamados de coquinhos, são produzidos em grandes quantidades e em grandes cachos pendentes que, quando verdes, costumam provocar salivação intensa com sabor levemente adocicado atraindo crianças, animais alados e domésticos, e quando chegam a maturação adquirem coloração arroxeada ou quase preta (NOGUEIRA, 2009). O fruto é uma baga glabra, ovoide, de dois centímetros de comprimento, que envolve um caroço bem rígido de albúmen branco, oleoso e duro, com altos teores de carboidratos; com frutificação de novembro a março (CAVALCANTI, 2014; ROCHA et al., 2015).

Figura 1. *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore. A. Hábito; B. Caule; C. Folhas jovens e maduras; D. Frutos.



Fonte: autoria própria (2018).

A carnaúba é uma palmeira nativa que agrega grandes valores para a economia do nordeste do país, se destacando das outras palmeiras exploradas comercialmente pela extração do pó cerífero proveniente das folhas. Essa matéria prima é atualmente a de maior importância, quando comparado aos outros produtos extraídos da espécie (DOS SANTOS COSTA; GOMES, 2016). É bastante utilizada na fabricação de cera, um produto natural de grande valor para as indústrias farmacêuticas, químicas, eletrônicas, alimentícias e cosméticas, devido a suas propriedades físico-químicas (TAVEIRA et al., 2014).

O pó cerífero e a cera são os recursos naturais de exploração econômica com grande representatividade no Brasil, sendo este o único detentor de produção e exportação do produto, chegando em torno de 20 toneladas por ano (CARVALHO, GOMES, 2008). A cera de carnaúba teve grande importância no desenvolvimento socioeconômico do Piauí e atualmente é o principal produtor do pó cerífero chegando em torno de 12.569 toneladas, seguido pelo Ceará e Maranhão com 5.509 e 509 toneladas, respectivamente, e juntos os três estados são responsáveis por mais de 53% da produção nacional (IBGE, 2011; BEZERRA, 2013).

Das fibras de folhas jovens são feitas coberturas, paredes e divisões de casas, fabricados utensílios trançados, vassouras, calçados e utilizados na fabricação de objetos usados em armazenamento como cofos, cestas, redes de pesca, cordas, tecidos rústicos, entre outros (CAVALCANTI, 2014; DOS SANTOS COSTA; GOMES, 2016). As folhas ainda podem ser usadas na agricultura como métodos preventivos para evitar a perda da umidade do solo e como adubo orgânico nas culturas frutícolas e de subsistência (CARVALHO, 1942; ALVES; COELHO, 2006; GOMES; NASCIMENTO, 2006). Também serve de forragem para o gado (ALVES; COELHO, 2006).

Quando jovens, do “peciolo” são retiradas as fibras empregadas em diversas finalidades, desde a fabricação de objetos domésticos, portas e janelas, a cercas que servem de proteção. Além disso, servem para a produção de celulose de alta qualidade (DOS SANTOS COSTA; GOMES, 2016).

O estirpe (caule), por ser reto e sem divisões, fornece madeira de boa qualidade empregada na construção civil e mercenaria, devido a sua resistência e durabilidade (NOGUEIRA, 2009; MARQUES, 2012).

A raiz é a única parte da planta utilizada de forma medicinal, devido as suas propriedades depurativas e diuréticas, sendo bastante utilizadas no tratamento de artrite, reumatismo, sífilis e suas manifestações secundárias (CARVALHO, 1942; NOGUEIRA, 2009; FREITAS, 2011; MARQUES, 2012; SOUSA, 2014; VIEIRA et al., 2016). Quando queimadas e pulverizadas, podem substituir o sal de cozinha (MOBIN; CAVALCANTI, 2000).

2.3 Cera epicuticular

A membrana cuticular, assim como outras estruturas dos vegetais, surgiu em consequência da evolução biológica e química das plantas superiores (HEREDIA et al., 1998) como mecanismo de defesa e adaptação a ambientes adversos. Além disso, a protege contra o ataque de micro-organismos patógenos, como os fungos e insetos (MESQUITA, 2005; VIEIRA et al., 2016). Essa membrana apresenta matriz polimérica (cutina) de natureza hidrofóbica que cobre as células epidérmicas das folhas, as chamadas ceras cuticulares, e estão associadas a lipídios solventes-solúveis (FERREIRA et al., 2005; LEIDE et al., 2011).

As ceras cuticulares estão divididas em ceras intracuticulares (incorporadas à cutina) e epicuticulares (depositadas na superfície) (LEIDE et al., 2011). Juntamente com os estômatos formam um sistema integrado, responsável pela manutenção e equilíbrio hídrico foliar, além de controlarem os níveis de radiação que incide sobre as folhas, permitindo o processo de fotossíntese e fotoproteção (GRANT et al., 2003).

Do ponto de vista químico, as ceras são constituídas de ésteres de álcoois e ácidos graxos, alcanos, aldeídos, hidrocarbonetos, esteróis livres e esterificados, triacilgliceróis, cetonas, álcoois e ácidos graxos livres, formando uma mistura complexa de compostos alifáticos (FERREIRA et al., 2005; FREITAS, 2011; LEIDE et al., 2011; PEREIRA, 2016). Podem ainda conter triterpenoides, flavonoides e taninos (SAMUELS; KUNST; JETTER, 2008; PIMENTEL, 2014; ATTARDA et al., 2017).

A disposição e composição da cera epicuticular na superfície da folha variam de espécie para espécie (MIMURRA et al., 1998; FERREIRA et al., 2005) e pode ser influenciada por fatores climáticos, como a temperatura e radiação, e estádios de crescimento (BONDADA et al., 1996; FERREIRA et al., 2005; FURLAN et al., 2006; BUSCHAHAUS et al., 2011; PIMENTEL, 2014). Podem formar desde finas camadas a placas (ou cristais), de formas e tamanhos diferentes.

C. prunifera apresenta camadas grossas de cera epicuticular dispostas de forma irregular na superfície das folhas (JEFFRE, 2006; PIMENTEL, 2014), que se acumulam principalmente nas folhas mais jovens (FERREIRA, 2009; SOUSA, 2014).

A cera epicuticular ou pó cerífero pode ser obtido pelo corte das folhas jovens “olho”, e das folhas maduras “palha” (GOMES, NASCIMENTO, 2006; SOUSA et al., 2005; FREITAS, 2013). Após o corte, estas são levadas ao campo (lastro ou estaleiro) onde ocorre a separação das folhas jovens das maduras. É ainda no campo que ocorre a secagem ao sol que dura de 6 a 12 dias. Depois dessa fase, são levadas para local fechado onde é feita a retirada do pó, que pode ser manual, com auxílio de um porrete ou mecânica por triturador de facas, até a retirada completa do pó (Figura 2). A folha sem a cera (bagana) é utilizada na produção artesanal, adubo, fertilizante e forragem para gado (ALVES; COELHO, 2006; GOMES; NASCIMENTO, 2006).

Figura 2. Etapas do processo de obtenção do pó cerífero da cera epicuticular de folhas jovens e maduras de *C. pruniifera* (Mill.) H.E. Moore.



Fonte: autoria própria (2018).

Do produto cerífero das folhas jovens (olho) se obtém a cera tipo I, de aspecto amarelo-clara, mais nobre, bastante utilizada nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Do produto cerífero das folhas maduras (palha) se origina a cera do tipo III (cor amarela ou alaranjada, utilizada na fabricação de cera para polimento, vernizes e tintas) e IV (cor preta, utilizada na fabricação de papel carbono), e que podem ainda apresentar variações, dependendo do grau de impureza e forma (barra ou escamas) (RODRIGUES, 2004; GOMES; NASCIMENTO, 2006).

Quimicamente, a cera de carnaúba é composta principalmente de ácido miricílico e ácido carnaúbico, um hidrocarboneto, três álcoois e uma lactona. Possui acidez de 2 a 7, saponificação 73 a 83°, álcoois (53 a 54%); iodo (13,5); 48% de ácidos

graxos; 1,6% de hidrocarbonetos; acetilo (55%) e de 0,14 a 0,51% de teor de cinzas (FREITAS, 2011).

2.4. Atividade biológica de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore

Pouco são os trabalhos de atividade biológica atribuída as partes vegetais da palmeira *C. prunifera* (RODRIGUES, 2004, SILVA et al., 2017).

Partes da planta que se tem registro de atividade biológica, são as raízes e as folhas. Nas folhas foram encontradas misturas de ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia longa, um sesquiterpeno, um diterpeno, derivados do ácido benzoico e derivados aril-propanoídicos e nos frutos dois ácidos graxos de cadeia longa, o ácido palmítico e ácido esteárico (RODRIGUES, 2004). Além disso, o extrato etanólico do fruto de carnaúba apresenta potente atividade antioxidante (SILVA et al., 2017). As Atividades antimicrobianas contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 (beta-lactamase negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (suscetível à oxacilina e penicilina), antioxidantes e analgésicas também já foram avaliadas (RODRIGUES, 2004).

Alguns trabalhos sobre as atividades biológicas da cera de carnaúba estão associados a compostos químicos, tais como as proteínas β -1,3-glucanase e chitinase, que possui atividade fungicida confirmada (CRUZ et al., 2002). Ácidos graxos de cadeia longa e o policosanol isolados e purificados da cera de carnaúba atuam como antiplaquetário, antitrombótico, anti-isquêmico, redutor de colesterol, contra oxidação de lipoproteínas do plasma (MOLINA et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2003). Das frações hexânicas e etanólicas de extratos das ceras foram isolados pela primeira vez, três tipos de triterpenoides: methylammara-25-ene-3 β ,20-diol (carnaubadiol), methylammara-20,25-dien-3-one e methylammara-20,25-dien-3 α -ol com atividades contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (DE ALMEIDA et al., 2016).

A raiz é a única parte da planta utilizada na medicina popular pelas propriedades depurativas e diuréticas, sendo bastante utilizadas no tratamento de artrite, reumatismo, sífilis e suas manifestações secundárias (CARVALHO, 1942; NOGUEIRA, 2009; FREITAS, 2011; MARQUES, 2012; VIEIRA et al., 2016). O extrato etanólico da raiz apresenta certa atividade antioxidante (AYRES et al., 2007).

3. REFERÊNCIAS

ALVES, M. O.; COELHO, J. D. Tecnologia e relações sociais de produção no extrativismo da carnaúba no nordeste brasileiro. Congresso da sociedade brasileira de economia e sociologia rural, 2006, **Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, v. 44, p.9.

ARAGÃO, A. R. F. **A árvore da vida: terminologia da cera de carnaúba no português do Brasil**. 2007. 252 f. Tese de doutorado (Linguística) - Universidade Federal do Ceará.

Arecaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

ATTARD, T. M.; BUKHANKO, N.; ERIKSSON, D.; ARSHADI, M.; GELADI, P.; BERGSTEN, U.; BUDARIN, V. L.; CLARK, J. H.; HUNT, A. J. Supercritical extraction of waxes and lipids from biomass: A valuable first step towards an integrated biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, 2017.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-7, 2008.

BERNAUD, R.; FUNCHAL, C. Atividade antioxidante do açaí. **Nutrição Brasil**, v. 10, n. 5, p. 310-316, 2011.

BEZERRA, K. C. B. **Características físicas e físico-químicas do fruto da carnaúba (*Copernicia prunifera* H. E. Moore)**. 2013. 42 f. Dissertação de mestrado (Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí.

BONDADA, B. R.; OOSTERHUIS, D. M.; MURPHY, J. B.; KIM, K. S. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, n. 1, p. 61-69, 1996.

BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 841-853, 2011.

CARVALHO, J. B. D. M. Ensaio sobre a carnaubeira. 1942.

CARVALHO, F. P. A.; GOMES, J. M. A. Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 2, p. 421-453, 2008.

CAVALCANTI, S. L. D. L. **Caracterização do óleo de carnaúba para uso como biolubrificante**. 2014. 77f. Dissertação de mestrado (Engenharia Mecânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- CAXAMBU, M. G.; GERALDINO, H. C. L.; DETTKE, G. A.; SILVA, A. R.; SANTOS, E. N. Palmeiras (Arecaceae) nativas no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, n. 1, p. 259-270, 2015. ISSN 2175-7860.
- CLEMENT, C.; LLERAS, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociencia**, v. 9, n. 1-2, p. 67-71, 2005.
- COIMBRA, M. C. **Caracterização dos frutos e dos óleos extraídos da polpa e amêndoa de guariroba (*Syagrus oleracea*), Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e macaúba (*Acromia aculeata*)**. 2010. 92f. Dissertação de mestrado (Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista.
- CRUZ, M. A. L.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; XAVIER-FILHO, J. Identification and partial characterization of a chitinase and a β -1, 3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 11-16, 2002.
- DE ALMEIDA, B. C.; ARAÚJO, B. Q.; CARVALHO, A. A.; FREITAS, S. D.; MACIEL, D. D.; FERREIRA, A. J.; TEMPONE, A. G.; MARTINS, L. F.; ALEXANDRE, T. R.; CHAVES, M. H.; LAGO, J. H. Antiprotozoal activity of extracts and isolated triterpenoids of 'carnauba' (*Copernicia prunifera*) wax from Brazil. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3280-3284, 2016.
- DE ANDRADE, G. A. P.; BARBOSA, R. R.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Intoxicação pelas folhas de carnaúba, *Copernicia prunifera* (Palmae) em ruminantes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 396-401, 2008.
- DOS SANTOS COSTA, V. L.; GOMES, J. M. A. Crédito e conservação ambiental no extrativismo da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore) no nordeste brasileiro no período de 2007 a 2012. **Interações (Campo Grande)**, v. 17, n. 1, 2016.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N.W.; ASMUSSEN, C.B.; BAKER, W.J.; HALEY, M.M.; LEWIS, C.E. **Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms**. Kew Publishing, Royal Botanical Gardens, Kew. 732pp. 2008.
- FERREIRA, C. D. S. **Comportamento de populações de carnaubeira em diferentes estádios de desenvolvimento no município de União – Piauí**. 2009. 60f. Dissertação de mestrado (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí.
- FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A.; SANTOS, J.B.; VENTRELLA, M.C.; MARQUES, A.E.; PROCÓPIO, S.O. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, p. 611-619, 2005.
- FREITAS, M. M. M. **Obtenção de álcoois de cadeia longa a partir da cera de carnúba**. 2011. 69 f. Dissertação de mestrado (Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará.

FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y.; SALATINO, A.; DOMINGOS, M. n-Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air Pollutants. **Environmental and experimental botany**, v. 58, n. 1-3, p. 100-105, 2006.

GOMES, J. A. F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R.; CANDIDO, M. J. D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M. A. D.; ROGÉRIO, M. C. P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volúmoso para a terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 58-67, 2009.

GOMES, J. M. A.; NASCIMENTO, W. L. . **Visão sistêmica da cadeia produtiva da carnaúba. In: GOMES, Jaíra Maria Alcoboca; SANTOS, Karla Brito dos; SILVA, Marcos Soares da (Orgs).** EDUFPI: 190 p. 2006.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Palms of the Americas.** Princeton, Princeton University Press, New Jersey. 1995.

HEREDIA, A.; CASADO, C. G.; LAGUNA, L.; REINA, J. J.; SERRANO, J. M.; DOMÍNGUEZ, E. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia**, n. 12, p. 293-305, 1998. ISSN 0214-0896.

JEFFREE, C. E. The fine structure of the plant cuticle. **Biology of the Plant Cuticle**, v. 23, p. 11-125, 2006.

LEIDE, J.; HILDEBRANDT, U.; VOGG, G.; RIEDERER, M. The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 9, p. 871-877, 2011.

LEITMAN, P.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R. C.; SOARES, K. *Arecaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

LEITE, I. A.; MARINHO, M. D. G. V. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidade indígena no município de Baía da Traição - PB. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, 2014.

LIEBERMAN, M.; LIEBERMAN, D.; HARTSHORN, G. S.; PERALTA, R. I. Small-scale altitudinal variation in lowland wet tropical forest vegetation. **The Journal of Ecology**, p. 505-516, 1985.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KHAN, F.; FERREIRA, E. Flora brasileira Lorenzi: *Arecaceae* (palmeiras). **Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 368. 2010.

LUBRANO, C.; ROBIN, J.; KHAIAT, A. Fatty acid, sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of six palm species in French Guiana. **Oleagineux (Paris)**, v. 49, n. 2, p. 59-65, 1994.

MARQUES, J. S. **Uso do pó da palha de carnaúba em compósitos de quitosana**. 2012. 74f. Dissertação de mestrado (Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MASETTO, T. E.; SCALON, S. P. Q.; BRITO, J. Q.; MOREIRA, F. H.; RIBEIRO, D. M.; REZENDE, R. K. S. Germinação e armazenamento de sementes de carandá (*Copernicia alba*). **Cerne**, v. 18, n. 4, p. 541-546, 2012.

MESQUITA, R. C. M. **Seleção de genótipos superiores de carnaubeira (*Copernicia sp*)**. Formulário de projeto de pesquisa apresentado ao FUNDECI-ETENE-BNB Fortaleza-CE 2005.

MIMURA, M. R. M.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; BAUMGRATZ, J. F. A. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 5, p. 581-588, 1998.

MOBIN, M.; CAVALCANTI, L. D. H. Myxomycetes em carnaubeira (*Copernicia prunifera* (Miller) HE Moore, Arecaceae). **Acta botanica brasílica**, v. 14, n. 1, p. 71-75, 2000.

MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; ARRUZAZABALA, L.; MÁZ, R. Therapeutic effect of D-002 (abexol) on gastric ulcer induced experimentally in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 59-62, 2005.

NEWMAN, D.J; GRAGG, G.M. Natural products as source of news drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Jounarl of Natural Products**. v. 75, p 311-335, 2012.

NOGUEIRA, D. H. **Qualidade e potencial de utilização de frutos de genótipos de carnaubeira (*Copernicia prunifera*) oriundos do estado do Ceará**. 2009. 111f. Tese de doutorado (Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba.

OLIVEIRA, G. L. D. S.; GOMES JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; FREITAS, R. M. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 293-300, 2015.

PEREIRA, D. D. S.; SOUZA, J. E. S.; PEREIRA, M. S.; GONÇALVES, N. R.; BEZERRA, A. M. E. Emergence and initial growth of *Copernicia prunifera* (Arecaceae) as a function of fruit maturation. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 1, p. 09-14, 2014.

PEREIRA, J. E. S. **Biossorção de cobre em solução aquosa utilizando os pós das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e da carnaúba (*Copernicia prunifera*)**. 2017. 89f. Dissertação de mestrado (Engenharia química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- PEREIRA, M. R.; MARQUES, J. S.; FONSECA, J. L. C. Biocomposites based on chitosan and carnauba straw powder. **Polímeros**, v. 24, p. 446-452, 2014.
- PIMENTEL, B. S. **Constituintes de ceras cuticulares de espécies de *Croton* L.** 2014. 96f. Dissertação de mestrado (Ciências - Botânica) - Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.
- PRUDENTE, R. C. C.; DE MOURA, R. B. Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região sudeste do Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 1, p. 24-31, 2013.
- QUEIROGA, V. P.; RAMOS, G. A.; ASSUNÇÃO, M. V.; ALMEIDA, F. Carnaubeira: Tecnologias de plantio e aproveitamento industrial. **Campina Grande: UFCG**, 2013.
- RAGUSA-NETTO, J. Nut density and removal in *Syagrus loefgrenii* Glassman (Arecaceae) in the brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 3, p. 726-734, 2016.
- ROCHA, T. G. F.; SILVA, R. A. R.; DANTAS, E. X.; VIEIRA, F. A. Phenology of *Copernicia prunifera* (Arecaceae) in a caatinga area of Rio Grande do Norte. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 673-681, 2015.
- RODRIGUES, V. P. ***Copernicia cerifera* Mart.: Aspectos Químicos e Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira.** 2004. 155f. Tese de doutorado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- RODRIGUES, L.C; SILVA, A.A.D., SILVA, R.B.D., OLIVEIRA, A.F.M.D., & ANDRADE, L.H.C.A. Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do sertão do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 451-457, 2013.
- RODRÍGUEZ, M. D; GÁMEZ, R.; GONZÁLEZ, J. E.; GARCÍA, H.; ACOSTA, C. P.; GOICOCHEA, E. Lack of developmental toxicity of D-003: a mixture of long-chain fatty acids in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 41, n. 1, p. 89-93, 2003.
- RUAS, E. L. A. **Estudo descritivo sobre o conhecimento de usuários e profissionais dos Centros de Saúde de Ceilândia - Distrito Federal - em relação a plantas medicinais e fitoterápicos.** 2013. 93f. Dissertação de mestrado (Ciências da saúde) - Universidade de Brasília.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2072-2075, 2011.

RUFINO, M. U. L.; COSTA, J. T. M.; SILVA, V. A.; ANDRADE, L. H. C. Knowledge and use of ouricuri (*Syagrus coronata*) and babaçu (*Orbignya phalerata*) in Buíque, Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.

SAMUELS, L.; KUNST, L.; JETTER, R. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, 2008.

SANDRI, D. D. O.; XISTO, A. L. R. P.; RODRIGUES, E. C.; MORAIS, E. C.; BARROS, W. M. Antioxidant activity and physicochemical characteristics of buriti pulp (*Mauritia flexuosa*) collected in the city of Diamantino – MTS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 3, 2017.

SILVA, A. P. S.; CERQUEIRA, G. S.; NUNES, L. C. C.; FREITAS, R. M. Effects of an aqueous extract of *Orbignya phalerata* Mart on locomotor activity and motor coordination in mice and as antioxidant *in vitro*. **Pharmazie**, v. 67, n. 3, p. 260-263, 2012.

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, C. H. A.; FERNANDES, C. C. L.; COSTA, M. V. O.; SILVA, F. F. M.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 11, p. 353-361, 2017.

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, C. H. A.; FERNANDES, C. C. L.; SILVA, L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; FERNANDES, A. A. O.; LIMA, I. M. T.; SILVA, C. M. G.; RODINA, D. Post-partum reproductive activity and estrus synchronization responsiveness in angonubian x sprd fed with dried carnauba wax palm fruit (*Copernicia prunifera*) long term. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, 2015.

SILVA, R. A. R.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; ARAÚJO, F. S. Padrões alométricos da palmeira carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore). **Nativa**, v. 3, n. 1, p. 56-58, 2015.

SILVA, R. B. D. **Potencial nutricional de seis espécies de Arecaceae ocorrentes em Pernambuco, Nordeste do Brasil**. 2012. 75f. Dissertação de mestrado (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco.

SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; ROCHA, T. G. F.; SANTANA, J. A. S.; VIEIRA, F. A. Ethnoecology and ethnobotany of the palm carnauba wax in brazilian semi-arid. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 587-597, 2015.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática; guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. ova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da Flora. 640 p. 2008.

TAVEIRA, L.R.; MÔRO, F.V.; MÔRO, J.R.; SILVA, B.M.S. Morfo-anatomia de plântulas de carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore–Arecaceae). **Revista de Ciências da Amazônia**, v. 1, n. 1, 2014.

VIEIRA, I. R.; OLIVEIRA, J. S.; VEROLA, C. F.; LOIOLA, M. I. B. Traditional knowledge, use, and management of *Copernicia prunifera* HE Moore (carnaúba) in Northeastern Brazil. **Revista Espacios**, v. 37, n. 08, 2016.

VIEIRA, I. R.; OLIVEIRA, J. S. D.; LOIOLA, M. I. B. Effects of harvesting on leaf production and reproductive performance of *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 117-123, 2016.

4. CAPITULO 1 - ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DE EXTRATO AQUOSO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore

RESUMO

A cera epicuticular (CE) extraída da superfície de folhas *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore (carnaúba) é a principal matéria-prima empregada na fabricação de cera, e bastante utilizada em sistemas de liberação controlada de fármacos, proporcionando aumento na eficácia e redução da toxicidade de agentes bioativos (antimicrobianos, antioxidantes e antineoplásicos), e aumento do tempo de prateleira de diversos alimentos, devido a sua ação antioxidante. Objetivou-se realizar a caracterização fitoquímica, atividade antioxidante, citotóxica e hemolítica de extratos aquosos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *C. prunifera*. Os extratos EAFJ e EAFM foram investigados quanto à presença de metabólitos secundários por análises fitoquímicas qualitativas (fenóis e taninos, flavonoides gerais, saponinas, alcaloides, ácidos orgânicos, polissacarídeos e açúcar redutor) e físico químicas (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR e eletroquímica), além da avaliação de atividades antioxidante, pelo conteúdo de fenóis totais e método 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS +•) e determinação do potencial citotóxico *in vitro* em linhagens de células tumorais e da atividade hemolítica em eritrócitos humanos. O rendimento percentual foi de 1,5% para EAFJ e 1,9% para EAFM. EAFJ e EAFM apresentaram pH levemente ácido, 5,7 e 6,0, respectivamente. O perfil fitoquímico mostrou a presença de taninos, saponinas e açúcar redutor em todos os extratos. O teor de fenólicos totais foram de $56,48 \pm 21,91$ mg EAG/g de extrato e $158,52 \pm 39,27$ mg EAG/g de extrato para EAFJ e EAFM, respectivamente. A atividade antioxidante pelo método ABTS +• das amostras foi de $34,9 \pm 4,8$ µg EAA/mg de extrato (EAFJ) e $100,3 \pm 15,2$ µg EAA/mg de extrato (EAFM). Ambos os extratos apresentaram elevada atividade citotóxica para linhagens de glioblastoma (SF-295) e baixa toxicidade para eritrócitos humanos. A cera epicuticular da carnaúba, portanto, surge como uma potencial fonte de compostos bioativos com atividade citotóxica, possibilitando ampliar o leque de aplicação para a espécie, de forma a agregar valor à cadeia produtiva da carnaúba.

Palavras-Chave: Atividade biológica, Carnaúba, Cera epicuticular, FTIR, Glioblastoma.

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF THE EPICUTICULAR WAX OF LEAFS OF *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore

ABSTRACT

The epicuticular wax (EC) extracted from the leaf surface of *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore is the main raw material used in the manufacture of carnauba wax, widely used in controlled drug release systems, providing increased efficacy and reduction of the toxicity of bioactive agents (antimicrobials, antioxidants and antineoplastics) and increase the shelf life of several foods due to their antioxidant action. The purpose of this work was to characterize the phytochemical, antioxidant, cytotoxic and hemolytic activity of aqueous extracts from the young leaf epicuticular wax (EAFJ) and mature (EAFM) of *C. prunifera*. The EAFJ and EAFM extracts were investigated for the presence of secondary metabolites by qualitative phytochemical analyzes (phenols and tannins, general flavonoids, saponins, alkaloids, organic acids, polysaccharides and reducing sugar) and physical chemistry (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR and electrochemistry), as well as the evaluation of antioxidant activities, by the total phenol content and the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) (ABTS + •) method, and in vitro cytotoxic potential determination in tumor cells and hemolytic activity in human erythrocytes. The percent yield was 1.5% for EAFJ and 1.9% for EAFM. EAFJ and EAFM showed slightly acid pH, 5.7 and 6.0, respectively. The phytochemical profile showed the presence of tannins, saponins and reducing sugar in all the extracts. The total phenolic content was 56.48 ± 21.91 mg EAG / g extract and 158.52 ± 39.27 mg EAG / g extract for EAFJ and EAFM, respectively. The samples showed antioxidant activity by the ABTS + • method, was 34.9 ± 4.8 µg EAA / mg extract (EAFJ) and 100.3 ± 15.2 µg EAA / mg extract (EAFM). Both extracts presented high cytotoxic activity for glioblastoma (SF-295) and low toxicity for human erythrocytes. Carnauba epicuticular wax, therefore, appears as a potential source of bioactive compounds with cytotoxic activity, making it possible to expand the application range for the species, in order to add value to the carnauba production chain.

Keywords: Biological activity, Carnauba, Epicuticular wax, FTIR, Glioblastoma.

4.1 INTRODUÇÃO

Copernicia prunifera (Mill.) H.E. Moore, conhecida popularmente como carnaúba e também chamada de “árvore da vida”, apresenta grande importância econômica para o Brasil, principalmente em razão de possuir na superfície das folhas um tipo de cera epicuticular que pode ser extraída em forma de pó, utilizada na fabricação de cera de grande interesse para as indústrias de diversos setores (RODRIGUES, 2004; FERREIRA, 2009; BEZERRA, 2013; OLIVEIRA et al., 2015; SOUSA et al., 2015).

Carnaúba é uma palmeira encontrada em diversos ecossistemas, adaptando-se facilmente a condições adversas, bastante resistente a clima seco, ocorrendo em terrenos alagadiços e salinos (HOLANDA et al., 2011). Trata-se de uma espécie de importância econômica, social e ecológica. Entretanto, a maioria dos estudos realizados com *C.prunifera* são de natureza principalmente etnobotânica e etnoecológica, portanto, relacionados ao manejo, aproveitamento econômico e interação homem-ambiente (SOUSA et al., 2015; VIEIRA et al., 2016).

Estudos sobre a fitoquímica e atividade biológica dos constituintes desta espécie ainda são escassos (RODRIGUES, 2004; SOUSA et al., 2007; AYRES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017; SILVA et al., 2017). Podendo ser registrados atividade antiprotozoária (DE ALMEIDA et al., 2016), fungicida (CRUZ et al., 2002) e redutora de colesterol, antiplaquetária, antitrombótica e anti-isquêmico (FREITAS, 2011). Todos realizados a partir de compostos isolados da cera epicuticular.

Nesse contexto, objetivou-se com a presente pesquisa o estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de extratos aquosos da cera epicuticular de folhas de *C. prunifera*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

O pó cerífero de folhas jovens e maduras de *Copernicia prunifera* foi obtido em julho de 2017 na fazenda Trapiá (S3°22'4.53" W41°46'25.9572"), localizada no município de Caxingó, Piauí, Brasil. O material testemunho foi depositado no Herbário Delta do Parnaíba (HDELTA), da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, com o número de tomo HDELTA 4596.

4.2.2 Obtenção de Extratos

Os extratos foram obtidos segundo a metodologia de Parekh et al. (2006), com adaptações. Foram utilizadas 20 g do pó de cera epicuticular de folhas jovens e maduras, para um volume de 200 mL de água destilada. As amostras foram posteriormente homogeneizadas, sob agitação constante por 24 horas, em temperatura ambiente. Ao fim do processo as soluções foram filtradas e secas em liofilizador.

Ao final foram produzidos dois extratos: extrato aquoso da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e extrato aquoso da cera epicuticular de folhas maduras (EAFM). O rendimento dos extratos foi calculado pela fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (M_{\text{Final}}/M_{\text{Inicial}}) \times 100$$

Onde M_{Final} é a massa do extrato seco e M_{Inicial} é o material vegetal utilizado para a preparação do extrato (20g).

4.2.3 Análise Fitoquímica e Físico-química

Para a prospecção fitoquímica qualitativa foi empregada a metodologia preconizada por Barbosa et al. (2004) e Matos (2009), com adaptações. Para a identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes nas amostras foram realizados, em triplicata, os seguintes testes: fenóis e taninos, flavonoides gerais, saponinas, alcaloides, ácidos orgânicos, polissacarídeos e açúcar redutor.

Para a identificação dos grupos funcionais orgânicos dos extratos aquosos da cera foram realizadas análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em espectrômetro Shimadzu IRAffinity-1S, na faixa espectral de 4000-700 cm^{-1} de resolução, pela técnica ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Em todas as amostras foram feitas 45 *scans* em cristal de seleneto de zinco (SeZn). Para comparação, foi utilizado o pó cerífero da CE natural, a fim de verificar as possíveis modificações causadas pela extração.

O Ensaio de voltametria de pulso diferencial foi realizado com o objetivo de avaliar qualitativamente a capacidade redox dos extratos, utilizando o Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT128N (EcoChemie, Utrecht, Holanda), juntamente com o software NOVA 1.6. Foi adotado uma configuração de três eletrodos, um eletrodo impresso de carbono (SPCE), como um eletrodo trabalho (4 mm), um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de referência Ag/AgCl (cloreto de prata).

Soluções de ácido gálico e quercetina foram utilizadas como modelo de referência de análise. Solução de HCl 0,1 M e pH 4.3 foi utilizada como eletrólito de suporte. Para a determinação voltamétrica, uma alíquota de 5 uL de amostra e 45 uL de tampão foi adicionada à superfície de eletrodo de trabalho. Um potencial constante de -0,2 V foi aplicado por 180 s para a pré-concentração de íons na superfície do eletrodo de trabalho. O potencial foi varrido de -0,2 V para + 0,1 V usando voltametria de pulso diferencial para retirar os íons de volta à solução. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente. As medidas de voltametria de pulso diferencial (PVD) foram realizadas utilizando um sistema de tri-eletrodos (eletrodo impresso de carbono – SPCE) em janela de potencial de -0,2 V a + 1 V.

4.2.4 Fenóis Totais

A quantificação do teor de fenólicos totais (TPC) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Singleton et al. (1999) com adaptações e determinada pelo método Folin-Ciocalteu. A cada 25 µL das amostras dos extratos foram adicionados 25 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 75 µL de água ultrapura. As amostras foram incubadas por 6 minutos em ausência de luz, e em seguida adicionado 100 µL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5%. Para os brancos e para o padrão, os extratos foram substituídos por 25 µL de água ultrapura e 25 µL de solução padrão de ácido gálico, respectivamente. O teste foi realizado em triplicata. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 593 nm.

A obtenção da concentração de fenólicos totais foi realizada utilizando a curva padrão do ácido gálico (10-200 µg de AG / mL de água), e os resultados expressos em equivalente a ácido gálico (GAE) por grama de extrato (GAE/g de extrato). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi de $y=0,0071x+0,0368$, com coeficiente de correlação $R^2=0,9983$, onde x representa a concentração e y, a absorbância a 593 nm. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas para Elisa 96 poços.

4.2.5 Atividade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi feita utilizando o método ABTS•+, descrita por Gião et al. (2007), através da adição de 7 mmol⁻¹ de sal de diamônio de ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) a 2,45 mmol⁻¹ de

solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (Merk, Damstadt, Alemanha), e incubada a temperatura ambiente por 16 horas, na ausência de luz. Após esse tempo a solução de ABTS•+ foi diluída em água ultrapura até a obtenção de uma solução com absorvância de $0.700 \pm 0,020$. Foi utilizado espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer, a 734 nm e os resultados expressos em VEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico).

As concentrações utilizadas de extrato e da curva padrão apartir de ácido ascórbico foram 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$. A leitura das absorvâncias foi realizada no tempo de 6 minutos, a 734 nm e os resultados expressos em VEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico).

ÍTEM 4.2.6 - SUPRIMIDO

4.2.7 Atividade Hemolítica

Para a avaliação da atividade hemolítica *in vitro* foi utilizada a metodologia de Marani et al. (2015). A amostra utilizada no teste foi coletada de um voluntário de grupo sanguíneo “O” Rh negativo. Ao sangue coletado foi adicionado EDTA como anticoagulante e centrifugado por 10 minutos com rotação de 3600 rpm, para separação dos eritrócitos do plasma. Após essa etapa, os eritrócitos foram lavados três vezes com salina a 0,85%, e em seguida, ressuspensos utilizando salina a 0,85%, na proporção de 1:10 (v/v). Dessa suspensão foram retirados uma alíquota de 400 µL e diluídos em 3600 µL de salina a 0,85%, na proporção de 1:4 (v/v). O teste foi realizado em sete concentrações e em triplicata: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,6 µg/mL e 7,8 µg/mL. Os extratos aquosos da CE de *C. prunifera* também foram diluídos em salina a 0,85%. Para cada triplicata foi utilizada 150 µL dos extratos e adicionados 150 µL de eritrócitos. Os microtubos foram levemente homogeneizados e incubados por 30 minutos na estufa a 37 °C, e posteriormente centrifugados por um minuto a 8000 rpm. Após essa etapa, foi retirado 100 µL do sobrenadante das amostras e adicionado a microplaca de 96 poços, para leitura em leitor de ELISA à 492 nm. Como controle positivo foi utilizado Triton X e como controle negativo a salina a 0,85%. O percentual da atividade hemolítica dos extratos foi expresso pela equação:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Abs}_E - \text{Abs}_S) / (\text{Abs}_T - \text{Abs}_S) \times 100$$

Onde:

% Hemólise = Percentual de hemólise

Abs_E = Absorbância dos extratos

Abs_S = Absorbância da salina

Abs_T = Absorbância do Triton X

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise Fitoquímica e Físico-química

Os extratos tiveram rendimento percentual bruto de 1,5% e pH 5.7 para EAFJ e 1,9% e pH 6 e para EAFM. A mesma faixa de pH também foi verificada em trabalhos realizados com outras partes da planta de *C. prunifera*, tais como, Cavalcanti (2014), realizado com óleo da semente do fruto (pH = 6.02); Guimarães et al. (2014), com sementes (pH = 3.46); e em outros estudos realizados com o fruto, pH de 4.5 (RUFINO et al., 2008), 4.43 (NOGUEIRA, 2009) e 4.55 (BEZERRA, 2013).

Os resultados dos testes fitoquímicos evidenciaram presença de taninos condensados ou catéquicos, saponinas e açúcar redutor (Tabela 1).

Taninos são compostos fenólicos solúveis em água, que tendem a formar complexos insolúveis (precipitados) em água com alcaloides, gelatinas, proteínas e metais pesados como o cobre (Cu) e o ferro (Fe), por exemplo (FRESNO, 1999; PESSUTO, 2006; SATO, 2014). Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são caracterizados por formação de precipitados verde-pardos (FRESNO, 1999), corroborando com os resultados dos testes obtidos no presente estudo.

De acordo com Rodrigues (2004), Fresno et al. (2009) e Silva (2012), saponinas podem ser encontradas ocasionalmente em espécies da família *Arecaceae* e são melhor evidenciadas em soluções aquosas, formando espumas persistentes. Conforme Fresno et al. (2009) e Carrera (2014), os flavonóides estão amplamente distribuídos nas angiospermas.

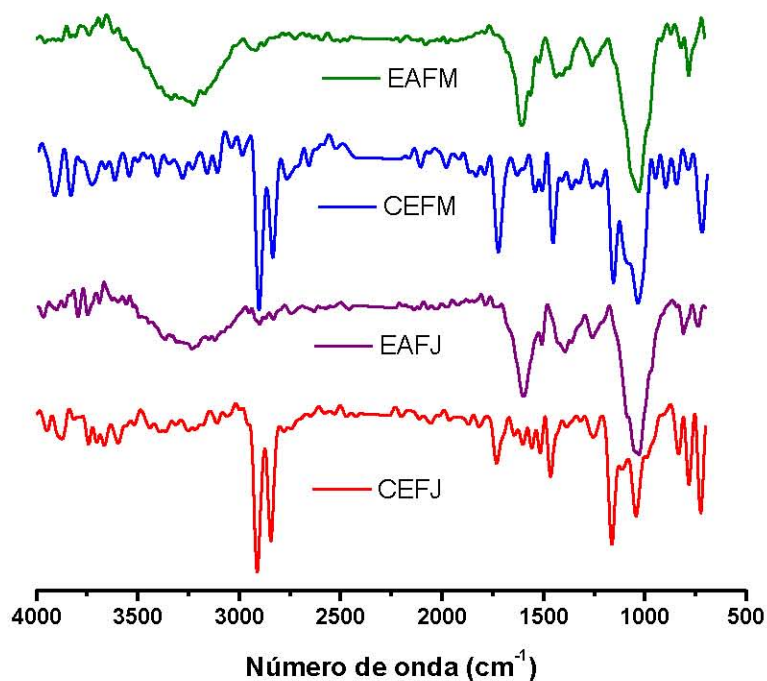
Tabela 1. Metabólitos secundários em extratos aquosos da cera epicuticular de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore obtidos das folhas jovens (EAFJ) e folhas maduras (EAFM).

Metabólitos Secundários	Amostras	
	EAFJ	EAFM
Fenóis	-	-
Taninos condensados ou catéquicos	+	+
Taninos hidrolisáveis ou pirogálicos	-	-
Tanino usando acetato de cobre	+	+
Antocianinas e antocianidinas	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas.	-	+
Chaconas e auronas	-	-
Flavanonóis	-	-
Saponinas	+	+
Alcaloides	+	-
Ácidos orgânicos	-	-
Polissacarídeos	-	-
Açúcar redutor	+	+

(+) presença; (-) ausência. Fonte: autoria própria (2018).

Nas análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) não foi observada diferença significativa entre os espectros de absorção dos extratos, provavelmente devido à superposição de bandas (Fig. 1). Mas, quando comparados os espectros das ceras, foi possível verificar que as bandas de 2911, 2846, 2844 e 1731 cm^{-1} são características das ceras naturais, embora pouco evidenciadas nos extratos. Essas bandas estão associadas à presença de alcanos, aldeídos, ácidos e carboxilas, componentes que fazem parte da composição natural das ceras, além de álcoois, esteroides e hidrocarbonetos (LEIDE et al., 2011; PEREIRA, 2017). Também indicam a presença de terpenos, fenóis e saponinas, caracterizados pelos grupamentos C-H, O-H e C=O, respectivamente (VANAJA; KAVITHA, 2016; OMRAN et al., 2017).

Figura 1. Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR-ATR) da cera epicuticular (CEFJ e CEFM), e dos extratos aquosos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore.



(Vermelho) CEFJ- cera epicuticular de folhas jovens; (roxo) EAFJ - extrato aquoso da cera epicuticular de folhas jovens; (azul) CEFM - cera epicuticular de folhas maduras; (verde) EAFM - extrato aquoso da cera epicuticular das folhas maduras. Fonte: autoria própria (2018).

Em ambos os extratos, as bandas de absorção registradas de 3234 cm^{-1} e as compreendidas entre $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ indicam forte presença de álcoois e fenóis, caracterizadas por vibrações de deformação axial de O-H e C-O (VIMALA et al., 2014; VANAJA; KAVITHA, 2016). Além disso, as bandas entre $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, presentes em todos os espectros, indicam a presença de éteres (C=O) e ésteres (C-O) aromáticos.

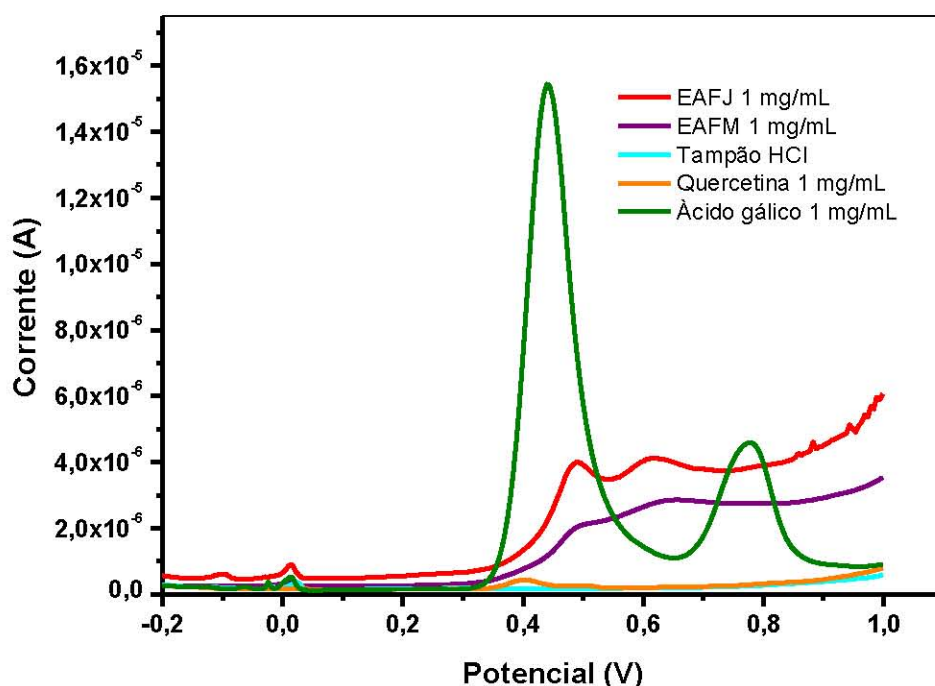
As bandas de absorção observadas em todos os espectros e compreendidas entre $1650\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ indicam deformação angular de C-H e de N-H de amidas, indicando a presença de proteínas (VIMALA et al., 2014; JEMAL et al., 2017). As bandas de $833\text{ a }782\text{ cm}^{-1}$ correspondem a deformação angular simétrica fora do plano de N-H de amidas primárias e secundárias, reforçando a presença de proteínas.

Já as bandas de $1600, 1515\text{ e }830\text{ cm}^{-1}$ presentes apenas nas ceras, corroboram com os resultados do estudo de Vandenburg e Wilder (1967), e indicam presença de C=C e C-C de anéis aromáticos.

A banda de absorção de 833 cm^{-1} , observada no extrato aquoso e no pó cerífero da CE da folha jovem, se refere a compostos de silício (Si), sugerindo deformação angular de silício-hidrogênio (Si-H) ou deformação axial de silício-oxigênio (Si-O). Essas informações são corroboradas por análise de fluorescência de raio x (FRX), que demonstrou que o Si é um dos elementos químicos presente na folha de carnaúba (PEREIRA, 2017), sugerindo que este também pode ser um elemento químico da CE. Essa banda também pode fazer parte da deformação angular fora do plano de C-H de fenóis (naftalenos).

Os perfis eletroquímicos de extratos vegetais podem ser diretamente determinados por métodos eletroquímicos quando os constituintes destes extratos são eletroativos. No voltamograma de pulso diferencial obtido, a curva azul (-) representa a oxidação do eletrólito de suporte (HCl 0,1 M, pH 3), enquanto as curvas vermelhas e roxo (-,-) mostram a oxidação dos extratos em tampão de fosfato 0.1 M e pH 3, e as curvas voltamétricas laranja e verde (-,-) mostram a oxidação dos padrões quercetina e ácido gálico, respectivamente (Fig. 4).

Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos a partir dos extratos da cera epicuticular de folhas jovens (EAFJ) e extrato de cera epicuticular de folhas maduras (EAFM) de *Copernicia Prunifera* (Mill.) H.E. Moore e padrões de ácidos fenólicos.



Padrões de ácidos fenólicos em 45 μ L de 0,1M HCl, pH 3 (-) 1 mg/mL de EAFJ, (-) 1 mg/mL de EAFM, (-) tampão HCl 0,1M (-) 1 mg/mL Quercetina, e (-) 1 mg/mL Ácido gálico. Potencial inicial (E_i) = -0,2 V, potencial final (E_f) = 1,0 V, amplitude do pulso = 50 mV, taxa de varredura = 50 mV s⁻¹, eletrodo de trabalho: carbono impresso, eletrodo de referência: Ag / AgCl (KCl 3 M) e contra eletrodo: platina. Fonte: autoria própria (2018).

Como observado, os picos anódicos entre 0,40 e 0,48 V podem ser atribuídos à oxidação de diferentes compostos polifenólicos, com sinais anódicos típicos a 0,44 V, 0,40 V, 0,48 V e 0,49 V para a oxidação do ácido gálico, quercetina, EAFJ e EAFM, respectivamente. Estes resultados corroboram os estudos realizados por Souza et al. (2004) e Magarelli et al. (2013) que evidenciaram ácidos fenólicos com pico anódico em aproximadamente 0,4 V, valor que pode ser atribuído à oxidação de grupos hidroxila no anel aromático que conduz à conversão de semiquinona em O-quinona. Com base neste pico anódico e a determinação voltamétrica de ácidos fenólicos presente nos extratos, o ácido gálico apresentou melhor resultado de correntes máximas de oxidação quando comparado ao obtido para o padrão quercetina, sendo considerado o padrão mais adequado para a determinação do teor de ácidos fenólicos totais nas amostras dos extratos.

4.3.2 Fenóis Totais e Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos na quantificação dos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} dos extratos aquosos de folhas jovens (EAFJ) e folhas maduras (EAFM) de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore.

	Fenóis Totais	ABTS	
	(mg GAE/g) média ± SD	(µg VEAC/mg extrato) média ±SD	(µg VEAC/mL extrato) média±SD
EAFJ	56,48±21,91	34,9 ± 4,8	14,9 ± 9,3
EAFM	158,52±39,27	100,3 ± 15,2	15,9 ± 1,7

Fonte: autoria própria (2018).

Como observado, houve variação de FT e atividade antioxidante pelo ABTS^{•+}, com menor registro para EAFJ do que para EAFM. Os valores dos teores de FT obtidos foram menores aos encontrados na literatura com a mesma espécie. No trabalho de Sousa et al. (2007), feito com extratos etanólicos de raízes, o teor de fenóis totais apresentou valor de 250±8,2 mgEAG/g de extrato, enquanto no de Oliveira et al. (2015), feito com extratos etanólicos de folhas, valores foram de 1454,54±12,56 mgEAG/g. Sousa et al. (2007), por sua vez, obtiveram FT de 44,60 mgGAE/g de E, e 33,2 mgGAE/g, em extrato etanólico (EE) e hexânico (EH) do fruto, respectivamente; 0,04 mgGAE/g (EE) para a polpa do fruto e, 0,69 mgGAE/g de E (EE) e 0,8326 mg GAE/g (EH) para a baga.

O método ABTS^{•+} se baseia na redução ou perda da absorbância do cátion ABTS^{•+} resultando na descoloração da solução (FLOEGEL et al., 2011). O método Folin-Ciocalteu, utilizado na determinação dos FT, também se baseia nas propriedades redox das substâncias, o que afirma uma correlação significativa com o método ABTS^{•+}. Portanto, o teor de fenólicos está correlacionado a esse método para determinar a contribuição desses compostos na atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos provenientes de extratos de extratos vegetais têm recebido bastante atenção, principalmente no que diz respeito às suas propriedades farmacológicas e biológicas, com destaque para a atividade antioxidante (OLIVEIRA et

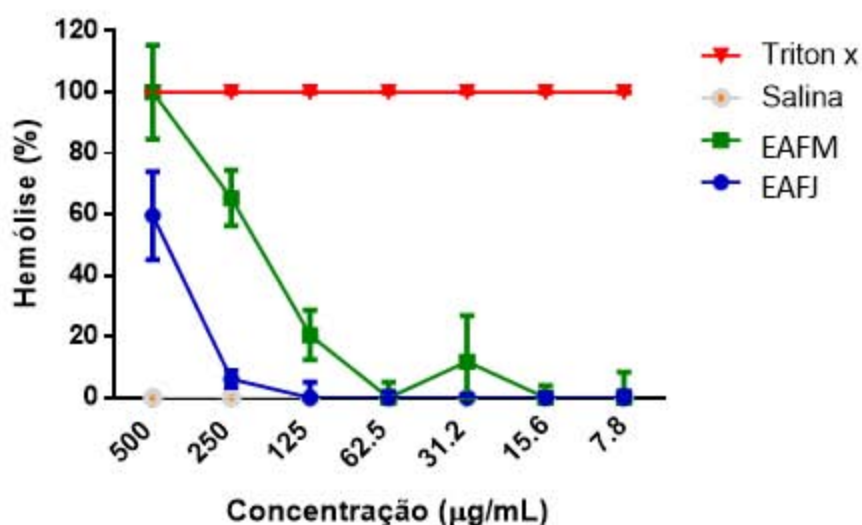
al., 2015). Quanto maior o conteúdo de FT do extrato maior é a atividade antioxidante, podendo estar associada à capacidade de atuarem como doadores de átomos de hidrogênio, agentes redutores e supressores de oxigênio (GALLEANO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

ÍTEM 4.3.3 - SUPRIMIDO

4.3.4 Atividade Hemolítica

O resultado da atividade hemolítica mostrou que o extrato EAFJ apresentou atividade hemolítica de 60% na maior concentração (500 µg/mL), enquanto o EAFM apresentou mais de 60% de atividade hemolítica, na concentração de 125 µg/mL (Figura 5). O teste de hemólise *in vitro* tem sido utilizado como *screening* para avaliação toxicológica de diferentes espécies vegetais (DESOTI et al., 2011; PASQUINI-NETTO et al., 2012; QUELEMES, et al., 2017).

Figura 3. Atividade hemolítica de extratos aquosos de folhas jovens (EAFJ) e maduras (EAFM) de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore.



Fonte: autoria própria (2018).

A atividade hemolítica dos extratos possivelmente se deve a presença de taninos que apresentam a capacidade de precipitar a hemoglobina (FRESNO et al., 2009). As concentrações registradas nas amostras estudadas estão acima das concentrações que apresentaram atividade citotóxica contra linhagens tumorais, representando dessa forma uma promissora fonte de compostos bioativos como forma alternativa para a busca de novos tratamentos dessas neoplasias.

4.4 CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos qualitativos indicaram a presença de taninos, saponinas e açúcares redutores nas duas amostras de extratos, sendo que apenas no EAFJ foi detectado a presença de alcaloide, e no EAFM, flavonóis. O conteúdo de fenólicos dos extratos, está intimamente ligada às atividades biológicas desempenhadas por esta classe de compostos, assim como as outras classes detectadas qualitativamente no presente estudo.

A identificação dos grupamentos no FT-IR sugere que os principais constituintes destes extratos foram compostos que apresentaram grupos aldeídos, ésteres, éteres e anéis aromáticos, confirmados nos resultados obtidos na análise fitoquímica e eletroquímica do extrato, os quais evidenciaram a presença de saponinas, fenóis e

flavonóides. Entretanto, a superposição de bandas mostra que não houve diferença significativa entre os extratos.

Os resultados de citotoxicidade mostraram que o EAFJ e o EAJM apresentaram potencial citotóxico melhor contra células tumorais do glioblastoma (SF-295). O EAFM mostrou-se mais citotóxico contra as demais linhagens, do que o EAFJ. O teste de atividade hemolítica demonstrou que, de modo geral, os extratos não provocaram hemólise nas concentrações que apresentaram atividade biológica, sugerindo que a cera epicuticular representa uma nova fonte alternativa para a pesquisa no tratamento de neoplasias.

REFERÊNCIAS

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-7, 2008.

BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista científica da UFPA**, v. 4, n. 5, p. 1-19, 2004.

BELLO, B. A.; KHAN, S. A.; KHAN, J. A.; SYED, F. Q.; MIRZA, M. B.; SHAH, L.; KHAN, L. B. Anticancer, antibacterial and pollutant degradation potential of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 490, n. 3, p. 889-894, 2017.

BEZERRA, K. C. B. **Características físicas e físico-químicas do fruto da carnaúba (*Copernicia prunifera* H. E. MOORE)**. 2013. 42 f. Dissertação de mestrado (Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí.

CARRERA, G.; BENEDITO, E. F.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; GASPI, F. O. G. Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 938-944, 2014.

CAVALCANTI, S. L. D. L. **Caracterização do óleo de carnaúba para uso como biolubrificante**. 2014. 77f. Dissertação de mestrado (Engenharia Mecânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CHO, C. L.; LEE, Y. Z.; TSENG, C. N.; CHO, J.; CHENG, Y. B.; WANG, K. W.; CHEN, H. J.; CHIOU, S. J.; CHOU, C. H.; HONG, Y. R. Hexane fraction of *Pluchea indica* root extract inhibits proliferation and induces autophagy in human glioblastoma cells. **Biomedical reports**, v. 7, n. 5, p. 416-422, 2017.

CRUZ, M. A. L.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V.S.; MACHADO, O. L.T.; XAVIER-FILHO, J. Identification and partial characterization of a chitinase and a β -1, 3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 11-16, 2002.

D'ANTONA, A.; VANWEY, L.; LUDEWIGS, T. Polarization in the land distribution, land use and land cover change in the Amazon. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 2, p.232, 2011.

DE ALMEIDA, B. C.; ARAÚJO, B. Q.; CARVALHO, A. A.; FREITAS, S. D.; MACIEL, D. D.; FERREIRA, A. J.; TEMPONE, A. G.; MARTINS, L. F.; ALEXANDRE, T. R.; CHAVES, M. H.; LAGO, J. H. Antiprotozoal activity of extracts and isolated triterpenoids of 'carnauba' (*Copernicia prunifera*) wax from Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3280-3284, 2016.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 1, 2011.

DO AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.

FERREIRA, C. D. S. **Comportamento de populações de carnaubeira em diferentes estádios de desenvolvimento no município de União – Piauí**. 2009. 60f. Dissertação de mestrado (Agronomia) - Universidade Federal do Piauí.

FILHO, A. C. V. A.; RODRIGUES, P. A. S.; BENJAMIN, S. R.; PAIM, R. T. T.; HOLANDA, M. O.; SILVA, J. Y. G.; MILO, T. S.; VIEIRA, I. G. P.; QUEIROZ, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. Hypolipidemic activity of P-methoxycinnamic diester (PCO-C) isolated from *Copernicia prunifera* against Triton WR-1339 and hyperlipidemic diet in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 198-203, 2017.

FLOEGEL, A. KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FREITAS, M. M. M. **Obtenção de álcoois de cadeia longa a partir da cera de carnúba**. 2011. 69 f. Dissertação de mestrado (Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará.

FRESNO, A. M. V. Farmacognosia General. In: SINTESIS, S. A. (Ed). **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Madrid: Gen LTC, cap. 2, p. 62. 1999.

GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 23-30, 2010.

GIÃO, M. S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; PEREIRA, C. I.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Infusions of portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2638-2647, 2007.

GUIMARÃES, W. G.; CAVALCANTE, J. F. M.; QUEIROZ, Z. F.; CASTRO, R. R.; NASCIMENTO, R. F. Extraction and characterization of fatty acids in carnaúba seed oil. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 246-250, 2014.

HAMED, M. M.; MOHAMED, M. A. M.; AHMED, W. S. Antioxidant potential, antitumor activity and phenolic profile of *Phoenix dactylifera* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 9, n. 5, p. 7, 2017.

HOLANDA, S. J.; DE ARAÚJO, F. S.; GALLÃO, M. I. Impacto da salinidade no desenvolvimento e crescimento de mudas de carnaúba (*Copernicia prunifera* (Miller) HE Moore). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 15, n. 1, 2011.

JEMAL, K.; SANDEEP, B.; POLA, S. Synthesis, characterization, and evaluation of the antibacterial activity of *Allophylus serratus* leaf and leaf derived callus extracts mediated silver nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

KRAUSE, M. S. **Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae**. 2013. 104f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

LEIDE, J.; HILDEBRANDT, U.; VOGG, G.; RIEDERER, M. The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 9, p. 871-877, 2011.

LUNA, J. D. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MAGARELLI, G., DA SILVA, J. G., DE SOUSA FILHO, I. A., LOPES, I. S. D., SOUZADE, J. R., HOFFMANN, L. V., & de CASTRO, C. S. P. Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 23-28, 2013.

MARANI, M. M.; DOURADO, F.S.; QUELEMES, P.V.; DE ARAÚJO, A. R.; PERFEITO, M.L.G.; BARBOSA, E.A.; VÉRAS, L.M.; COELHO, A. L. R.; ANDRADE, E.B.; EATON, P.; LONG, J. P. F.; AZEVEDO, R.B.; DELERUE-MATOS, C.; LEITE, J.R.S.A. Characterization and biological activities of ocellatin

peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of Natural Products**, v.78, n 7, p. 1495-1504, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MATOS, F, J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3 ed. Fortaleza, UFC, 2009

NOGUEIRA, D. H. **Qualidade e potencial de utilização de frutos de genótipos de carnaubeira (*Copernicia prunifera*) oriundos do estado do Ceará**. 2009. 111f. Tese de doutorado (Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba.

OLIVEIRA, G. L. D. S. GOMES JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; FREITAS, R. M. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 293-300, 2015.

OMRAN, R.; AL-TAEE, Z. M.; HASHIM, H. O.; AL-JASSANI, M. J. Preventive effects of *Phoenix dactylifera* polyphenols against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary cancer. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 7, p. 172-181, 2017.

PAREKH, J.; JADEJA, D.; CHANDA, S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, n. 4, p. 203-210, 2006.

PASQUINI-NETTO, H.; MANENTE, F. A.; MOURA, E. L.; REGASINI, L. O.; PINTO, M. E. F.; BOLZANI, V. D. S.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; VELLOSA, J. C. R. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul.(Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 666-672, 2012.

PEREIRA, J. E. S. **Biossorção de cobre em solução aquosa utilizando os pós das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e da carnaúba (*Copernicia prunifera*)**. 2017. 89f. Dissertação de mestrado (Engenharia Química) - Universidade Federal do rio Grande do Norte.

PESSUTO, M. B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante**. 2006. 105f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá.

PRUDENTE, R. C. C.; DE MOURA, R. B. Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região sudeste do Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 1, p. 24-31, 2013.

RAMAZANI, A.; MASHHADI, M.; KAMALINEJAD, M.; TAVAKOLIZADEH, M.; BALAGHI, F.; NOUBARANI, M.; ESKANDARI, R.; SHIRAZI, F. H. *Phoenix dactylifera* L. fruit induces cell proliferation of A2780, A172 and HFFF2 cell lines. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 35-44, 2016.

RODRIGUES, V. P. ***Copernicia cerifera* Mart.: Aspectos Químicos e Farmacológicos de uma Palmeira Brasileira**. 2004. 155F. Tese de doutorado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RUFINO, M. U. L.; COSTA, J. T. M.; SILVA, V. A.; ANDRADE, L. H. C. Knowledge and use of ouricuri (*Syagrus coronata*) and babaçu (*Orbignya phalerata*) in Buíque, Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.

SATO, S. T. A. **Estudo comparativo do efeito da clivagem ácida (escalas analítica e piloto) de proantocianidinas presentes em extratos de matrizes vegetais da Amazônia**. 2014. 85f. Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Univerdidade Federal do Pará.

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, C. H. A.; FERNANDES, C. C. L.; COSTA, M. V. O.; SILVA, F. F. M.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 11, p. 353-361, 2017.

SILVA, R. B. D. **Potencial nutricional de seis espécies de Arecaceae ocorrentes em Pernambuco, Nordeste do Brasil**. 2012. 75f. Dissertação de mestrado (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, 1999. p.152-178.

SORADECH, S.; PETCHTUBTIM, I.; THONGDON-A, J.; MUANGMAN, T. Development of wax-incorporated emulsion gel beads for the encapsulation and intragastric floating delivery of the active antioxidant from *Tamarindus indica* L. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 380, 2016.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; ROCHA, T. G. F.; SANTANA, J. A. S.; VIEIRA, F. A. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira carnaúba no semiárido brasileiro. **Cerne**, v. 21, n. 4, 2015.

VANAJA, D.; KAVITHA, S. A study on phytochemicals, antioxidant activity and ft-ir analysis of *Rhapis excelsa* (Thunb.) a. henry. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, p. 5, 2016.

VANDENBURG, L.; WILDER, E. The structural constituents of carnauba wax. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 47, n. 12, p. 514-518, 1970.

VIEIRA, I. R.; OLIVEIRA, J. S.; VEROLA, C. F.; LOIOLA, M. I. B. Traditional knowledge, use, and management of *Copernicia prunifera* HE Moore (carnaúba) in Northeastern Brazil. **Revista Espacios**, v. 37, n. 08, 2016.

VIMALA, K.; SUNDARRAJ, S.; PAULPANDI, M.; VENGATESAN, S.; KANNAN, S. Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bcl-2 expression in breast and colon carcinoma. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 160-172, 2014.

WANG, G.; WANG, J.; DU, L.; LI, F. Effect and mechanism of total flavonoids extracted from *Cotinus coggygria* against glioblastoma cancer *in vitro* and *in vivo*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

5. CAPITULO 2 – INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES NA REMOÇÃO DA CERA EPICUTICULAR DE FOLHAS DE *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HEMOLÍTICA

RESUMO

A folha de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore é a parte da planta que dispõe de maior importância econômica devido à extração do pó cerífero da cera epicuticular que as recobre. Estudos que explorem o potencial biológico utilizando a folha são escassos. Objetivou-se realizar a caracterização fitoquímica, atividade antioxidante e hemolítica de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de folhas jovens e maduras de *C. prunifera* após tratamento com clorofórmio (CHCl_3) e hexano (C_6H_{12}) para a remoção da cera epicuticular. Os extratos foram investigados quanto à presença de metabólitos secundários por análises fitoquímicas qualitativas (fenóis e taninos, flavonoides gerais, saponinas, ácidos orgânicos, polissacarídeos e açúcar redutor) e físico químicas (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR), além da avaliação da atividade antioxidante, pelo método 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS +•) e determinação da atividade hemolítica. A microscopia eletrônica de superfície (SEM) mostrou eficácia dos tratamentos na remoção da cera das folhas. As folhas maduras tiveram rendimento percentual bruto maior em relação ao rendimento das folhas jovens. Todos os extratos de ambos os tratamentos (clorofórmio e hexano) apresentaram pH neutro, com exceção dos extratos etanólico (4.7) e metanólico (5.9) de folhas verdes tratadas com hexano, que apresentaram pH ácido e levemente ácido, respectivamente. Os testes fitoquímicos qualitativos mostraram a presença de açúcar redutor, taninos condensados e saponinas nos extratos, com exceção do extrato etanólico das folhas jovens tratadas com clorofórmio (EEFJC) e do extrato aquoso das folhas jovens tratadas com hexano (EAFJH), onde não foram detectadas a presença de saponinas. A análise de FTIR revelou a presença de bandas associadas a esses metabólitos. A atividade antioxidante (AA) dos extratos de folhas tratadas com clorofórmio variou entre 22,7 a 221,85 $\mu\text{g VEAC/mg}$ de extrato, enquanto a AA dos extratos de folhas tratadas com hexano, variou de 132,11 a 217,43 $\mu\text{g VEAC/mg}$ de extrato. Diante dos resultados obtidos, verificou-se que os tratamentos químicos foram eficazes na remoção da cera epicuticular da superfície das folhas, e que estes promoveram diferenças nas atividades entre os extratos, que podem ser demonstradas nos resultados das análises das atividades antioxidante e hemolíticas.

Palavras-Chave: ABTS. Atividade Hemolítica. FTIR. Tratamento químico. Folhas. *Copernicia*.

INFLUENCE OF SOLVENTS IN THE REMOVAL OF THE EPICUTICULAR WAX OF LEAVES OF *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND HEMOLYTIC ACTIVITY

ABSTRACT

The leaf of *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore is the part of the plant that has greater economic importance, due to the extraction of the ceriferous powder of the epicuticular wax that recovers them. Studies exploring the biological potential using leaf are scarce. The objective of this study was to characterize the phytochemical, antioxidant and hemolytic activity of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of young and mature leaves of *C. prunifera* after treatment with chloroform (CHCl₃) and hexane (C₆H₁₂) to verify their influence on them. The extracts were investigated for the presence of secondary metabolites by qualitative phytochemical analyzes (phenols and tannins, general flavonoids, saponins, organic acids, polysaccharides and reducing sugar) and physical chemistry (Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR) of antioxidant activities by the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS + •) method and determination of hemolytic activity in human erythrocytes. SEM showed the effectiveness of the treatments in the removal of the wax from the leaves. Mature leaves had a higher crude percentage yield compared to young leaf yield. All extracts from both treatments (chloroform and hexane) presented neutral pH, except for ethanolic (4.7) and methanolic (5.9) extracts of green leaves with hexane, which presented slightly acidic pH. The qualitative phytochemical tests showed the presence of reducing sugar, condensed tannins and saponins in the extracts, except for the ethanolic extract of the young leaves treated with chloroform (EEFJC) and the aqueous extract of young leaves treated with hexane (EAFJH). The presence of saponins. FTIR analysis revealed the presence of bands associated with these metabolites. The antioxidant activity (AA) of leaf extracts treated with chloroform ranged from 22.7 to 221.85 ug VEAC / mg extract, while the AA of leaf extracts treated with hexane ranged from 132.11 to 217.43 ug VEAC / mg extract. It was verified that the chemical treatments were effective in the removal of the epicuticular wax from the leaf surface, and that these promoted differences in the activities between the extracts, which can be demonstrated in the results of the analysis of the antioxidant and hemolytic activities.

Keywords: ABTS. Hemolytic activity. Chemical treatment. FTIR. Leaves. *Copernicia*.

5.1 INTRODUÇÃO

Copernicia prunifera, conhecida popularmente como carnaúba e pertencente à família Arecaceae, é uma palmeira nativa do semiárido Nordeste, podendo ser encontrada nas regiões Norte e Centro-Oeste do País (FLORA DO BRASIL 2018), formando densos carnaubais (ROCHA et al., 2015).

A carnaubeira é uma palmeira nativa que agrega grandes valores para a economia do nordeste do país, se destacando das outras palmeiras exploradas comercialmente pela extração do pó cerífero proveniente das folhas. Essa matéria prima é atualmente a de maior importância, quando comparado aos outros produtos extraídos da espécie (COSTA, GOMES, 2016). É bastante utilizada na fabricação de cera, um produto natural de grande valor para as indústrias farmacêuticas, químicas, eletrônicas, alimentícias e cosméticas, devido a suas propriedades físico-químicas (TAVEIRA et al., 2014).

A cera de carnaúba teve grande importância no desenvolvimento socioeconômico do Piauí, que atualmente é o principal produtor do pó cerífero, chegando a produzir em torno de 9.983 toneladas/ano, seguido pelo Ceará e Maranhão, com 7.307 e 562 toneladas/ano, respectivamente (IBGE, 2016; BEZERRA, 2013).

A cera epicuticular que recobre as folhas, principalmente as mais jovens, é rica em triacantanol (TRIA), um álcool alifático de cadeia longa, usada no revestimento de frutos *in natura* (MOTA et al., 2006), e na composição de produtos industriais como cosméticos, cápsulas de remédios, componentes eletrônicos, produtos alimentícios, cera polidoras e revestimentos (DE CARVALHO, 2017).

Do produto cerífero do olho (folhas jovens), se obtém a cera tipo I, de aspecto amarelo-clara, bastante utilizada nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Do produto cerífero da palha (folhas maduras) se origina a cera do tipo III e IV, de cor amarela ou alaranjada e, cor escura, respectivamente e, que podem ainda apresentar 12 tipos de variações, dependendo do grau de impureza e forma (barra ou escamas). (GOMES, NASCIMENTO, 2006).

A cera epicuticular consiste num mecanismo de adaptação a fatores ambientais e agentes externos, proteção contra patógenos, bem como contribui para a manutenção e equilíbrio da palmeira, dificultando a perda de água e controlando os níveis de irradiação que incide sobre elas (MESQUITA, 2005; VIEIRA et al., 2016). As aplicações biológicas relacionadas ao extrato da folha da carnaúba desprovidas de cera

epicuticular são escassas. De forma geral, a cera epicuticular é retirada de folhas previamente cortadas e desidratadas ao sol, manualmente por batição (porrete), ou mecânica por triturador de facas. (GOMES, 2006; FREITAS, 2011; SOUSA et al., 2015). Estes métodos, entretanto, não apresentam 100% de eficácia na retirada do pó.

Não há na literatura registro de informações sobre o pó cerífero propriamente dito, em relação a estudos fitoquímicos, físico-químicos, biológicos ou medicinais. Os estudos sobre este tema estão mais voltados para o produto da derivação do pó, a cera, seguido de estudos sobre as fibras e frutos da espécie.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a fitoquímica, atividade antioxidante e hemolítica de extratos foliares de *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore após remoção da cera epicuticular de folhas jovens (olho) e maduras (palha) com diferentes solventes.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e preparo do material vegetal

Folhas jovens e maduras, além de amostras para herborização (FIDALGO; BONONI, 1989), foram coletadas na fazenda Trapiá (S3°22'4.53" W41°46'25.9572"), localizada no município de Caxingó, Piauí, Brasil. O material testemunho encontra-se depositado no Herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, com o número de tombo HDELTA 4596.

ITEM 5.2.2 - SUPRIMIDO

5.2.3 Preparo, obtenção e rendimento dos extratos

Das folhas (jovens/maduras) tratadas com clorofórmio foram produzidos extratos aquosos (EAFJC/EAFMC), etanólicos (EEFJC/EEFMC) e metanólicos (EMFJC/ EMFMC). Da mesma forma foram feitos extratos com a folhas (jovens/maduras), tratadas com hexano: extrato aquosos (EAFJH/ EAFMH), etanólicos (EEFJH/EEFMH) e metanólicos (EMFJH/ EMFMH). Após o tratamento, extratos foram produzidos e tiveram seus rendimentos percentuais brutos (RPB) calculados.

A metodologia para a preparação dos extratos seguiu Parekh et al. (2006), modificada por Miranda et al. (2015). Foram utilizadas três porções de 30 g de folhas trituradas para um volume de 300 mL de cada solvente de extração: água destilada, etanol (EtOH) e metanol (CH₃OH), na proporção 1:10 (m/v). As amostras foram mantidas sob agitação constante por 24 horas, sem aquecimento, e em seguida, filtradas. As soluções alcoólicas (etanol e metanol) passaram por evaporador a vácuo (Concentrador plus - Eppendorf®) e posteriormente por liofilizador (*Enterprise I*).

O rendimento dos extratos foi calculado pela fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (M_{\text{Final}}/M_{\text{Inicial}}) \times 100$$

Onde M_{Final} é a massa do extrato seco e M_{Inicial} é o material vegetal utilizado para a preparação do extrato (30g).

5.2.4 Fitoquímica

Para a determinação das principais classes de metabólitos secundários: fenóis, taninos, saponinas, ácidos orgânicos, açúcar redutor, polissacarídeos, flavonoides,

presentes nas amostras, foi empregada a metodologia citada por Matos (2009). Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.2.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada com o objetivo de identificar os principais grupos funcionais orgânicos presentes nos extratos aquosos e alcoólicos de folhas pós-tratamentos químicos de *C. prunifera*.

A análise espectroscópica dos extratos das folhas tratadas foi realizada em espectrômetro na região de infravermelho Shimadzu IRAffinity-1S, na faixa espectral de 4000-700 cm^{-1} de resolução, pela técnica ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Em todas as amostras foram feitas 45 *scans* em cristal de seleneto de zinco (SeZn), para a identificação dos grupos funcionais presentes nos extratos.

5.2.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de ABTS•+, foi utilizada a metodologia descrita por Gião et al. (2007) com algumas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução do o cation radical ABTS •+, através da adição de 7 mmol L⁻¹ de sal de diamónio de ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich)) a 2,45 mmol L⁻¹ de soluções de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Merk, Damstadt, Alemanha), incubada a temperatura ambiente por 16 horas, ao abrigo da luz. Após esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em água ultrapura até se obter uma solução com absorbância de $0.700 \pm 0,020$, utilizando um espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer (Jenway, United Kingdom), a 734 nm.

Posteriormente, foi preparada concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato e do padrão ácido ascórbico. Para a leitura das absorbâncias foram utilizados 60 μL de cada amostra e 3 mL da solução de ABTS •+, durante 6 minutos, a 734 nm. Os resultados foram expressos em VEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Ácido Ascórbico).

5.2.7 Atividade Hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Marani et al. (2015). A amostra utilizada no teste foi coletada de um voluntário sadio de grupo sanguíneo “O” Rh negativo. Ao sangue coletado foi acrescentado EDTA como anticoagulante e centrifugado com rotação de 3600 rpm por 10 minutos para separação dos eritrócitos do plasma. Os eritrócitos, então, foram lavados três vezes com salina a 0,85%, e, em seguida, ressuspensos utilizando novamente salina a 0,85% na proporção de 1:10 (v/v). Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 400 µL e diluída em 3600 µL de salina a 0,85%, na proporção de 1:4 (v/v). O teste foi realizado em sete concentrações e em triplicata: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,6 µg/mL e 7,8 µg/mL, dos extratos aquosos, etanólicos e metanólicos das folhas tratadas, também diluídas em salina. Para cada triplicata foi utilizada 150 µL da amostra dos extratos e adicionadas 150 µL de sangue diluído. As amostras foram levemente homogeneizadas e incubadas por 30 minutos na estufa a 37 °C, e centrifugados por um minuto a 8000 rpm. Após essa etapa, foi retirado 100 µL do sobrenadante e feita a leitura em leitor de ELISA a 492 nm. Como controle positivo foi utilizado o Triton X e como controle negativo a salina a 0,85%. O percentual da atividade hemolítica dos extratos foi expresso pela equação:

$$\% \text{ Hemólise} = (Abs_E - Abs_S) / (Abs_T - Abs_S) \times 100$$

Onde:

% Hemólise = Percentual de hemólise

Abs_E = Absorbância dos extratos

Abs_S = Absorbância da salina

Abs_T = Absorbância do Triton

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

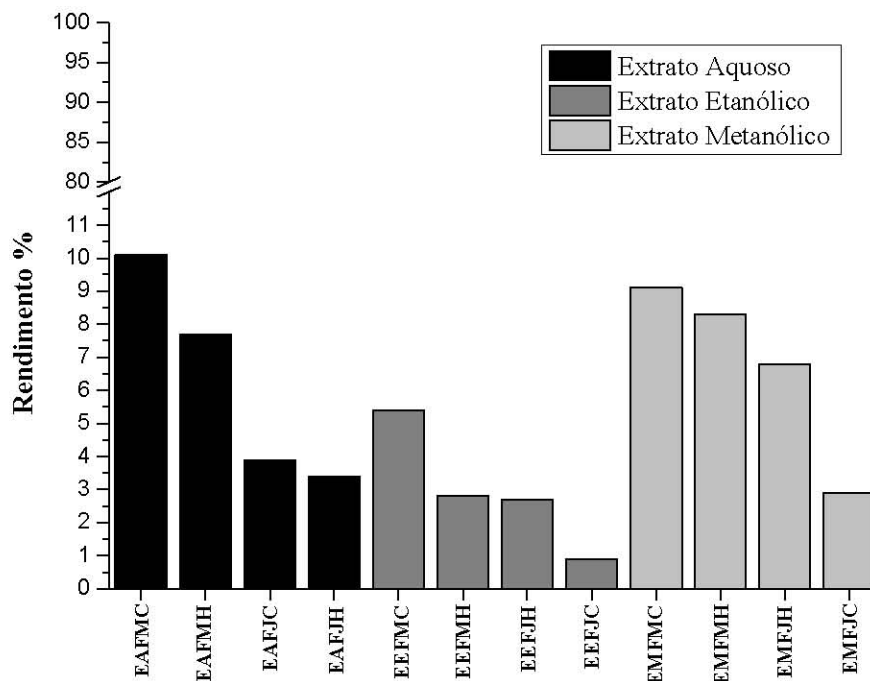
ITEM 5.3.1 - SUPRIMIDO

5.3.2 Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos de folhas tratadas com clorofórmio foi 2,9% e 9,1%, para EMFJC e EMFMC, respectivamente – extratos metanólicos; de 0,9% e 5,4% para EEFJC e EEFMC, respectivamente – extratos etanólicos; e 3,9% e 10,1%, para EAFJC e EAFMC, respectivamente - os extratos aquosos.

Para os extratos de folhas tratadas com hexano, os extratos metanólicos tiveram rendimento de 6,8% para EMFJH e 8,3% para EMFMH; as extrações etanólicas tiveram rendimento de 2,7% e 2,8% para EEFJH e EEFMH, respectivamente; e os extratos aquosos de ,4% para EAFJH e 7,7% para EAFMH.

Figura 3. Rendimento Percentual bruto dos extratos de folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.



Folhas jovens tratadas com clorofórmio/hexano: - extrato aquoso (EAFJC/EAFJH); extrato etanólico (EEFJC/EEJH); extrato metanólico (EMFJC/EMFJH). Folhas maduras tratadas com clorofórmio/hexano: - extrato aquoso (EAFMC/EAFMH); extrato etanólico (EEFMC/EEFMH); extrato metanólico (EMFMC/EMFMH). Fonte: autoria própria (2018).

Os valores de pH dos extratos de folhas jovens tratadas com clorofórmio/hexano foram alcalinos: extrato aquoso (8.2/7.9), etanólico (6.5/6.4) e metanólico (6.8/6.7). Enquanto nas extrações das folhas verdes apenas os extratos aquosos (6.2/6.2) e os extratos etanólicos (6.7) e metanólicos (6.1) das folhas tratadas com hexano apresentaram pH neutro, já nas folhas verdes tratadas com clorofórmio, os pH encontrados foram de 4.7 e 5.9, para extrato etanólico (ácido) e metanólico (levemente ácido), respectivamente (Tabela 1).

As mesmas faixas de pH foram encontradas em outros estudos com *C. prunifera*, como os de Pinto et al. (In prep.), em extratos da cera epicuticular de folhas jovens (pH = 5.7) e maduras (pH = 6.0); Cavalcanti. (2014), realizado com óleo de semente do fruto (pH = 6.02); Guimarães et al. (2014), também utilizando sementes, registrou pH menor, 3.46; em estudos realizados com o fruto, o pH registrado foi de 4.55 (Bezerra, 2013), 4.43 (Nogueira, 2009) e 4.5 (Rufino et al., 2008).

Tabela 1. pH dos extratos de folhas jovens e maduras de *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore, tratadas com clorofórmio e hexano.

Tratamento	Amostras	Método de extração		
		Aquosa (pH)	Etanólica (pH)	Metanólica (pH)
Clorofórmio	Folhas Jovens	8.2	6.5	6.8
	Folhas Maduras	6.2	6.7	6.1
	Folhas Jovens	7.9	6.4	6.7
Hexano	Folhas Maduras	6.2	4.7	5.9

Fonte: autoria própria (2018).

5.3.3 Fitoquímica

Os resultados obtidos da análise fitoquímica qualitativa mostraram a presença de açúcar redutor e taninos condensados comum em todas as extrações e em todas as amostras. Saponinas não foram detectadas no EEFJC e EAFJH. No teste de polissacarídeos, onde o resultado positivo se dá pelo escurecimento da amostra quando adicionada o Lugol, alguns extratos das folhas maduras formaram precipitados como EAFMH, EMFMH, EEFMC, EMFMC (Tabela 2), sendo considerados negativos para esse teste. Uma possível explicação para este fato pode ser devido à presença de taninos na amostra, os quais formam complexos com alguns polissacarídeos gerando precipitados (PESSUTO, 2006).

Os resultados corroboram os registrados no estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com a cera epicuticular das folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Pinto et al. In prep.), onde foram verificados taninos, saponinas e açúcar redutor em suas composições. Silva et al. (2017) relataram os mesmos metabólicos em extratos etanólico e hexânico do fruto e diferentes partes de *C. prunifera*.

Tabela 2. Fitoquímica qualitativa de extratos das folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore.

Tratamento	Extratos	Metabólitos secundários								
		ALC	AÇR	ACO	FEN	TAC	TAH	SAP	POL	FLA
Clorofórmio	EAFJC		+	-	-	+	-	+	-	-
	EEFJC		+	-	-	+	-	-	-	-
	EMFJC		+	-	-	+	-	+	-	-
	EAFM		+	-	-	+	-	+	-	-
	EEFMC		+	-	-	+	-	+	-	-
	EMFM		+	-	-	+	-	+	-	-
Hexano	EAFJH		+	-	-	+	-	-	-	-
	EEFJH		+	-	-	+	-	+	-	-
	EMFJH		+	-	-	+	-	+	-	-
	EAFM		+	-	-	+	-	+	-	-
	EEFM		+	-	-	+	-	+	-	-
	EMFM		+	-	-	+	-	+	-	-

ALC: Alcaloides, AÇR: Açúcar redutor, ACO: Ácidos orgânicos, FEN: Fenóis, TAC: Taninos Condensados, TAH: Taninos hidrolisáveis, SAP: Saponinas, POL: Polissacarídeos, FLA: Flavonoides. Fonte: autoria própria (2018). **Folhas jovens tratadas com clorofórmio/hexano: - extrato aquoso (EAFJC/EAFJH); extrato etanólico (EEFJC/EEJH); extrato metanólico (EMFJC/EMFJH). Folhas maduras tratadas com clorofórmio/hexano: - extrato aquoso (EAFMC/EAFMH); extrato etanólico (EEFMC/EEFMH); extrato metanólico (EMFMC/EMFMH). Fonte: autoria própria (2018).

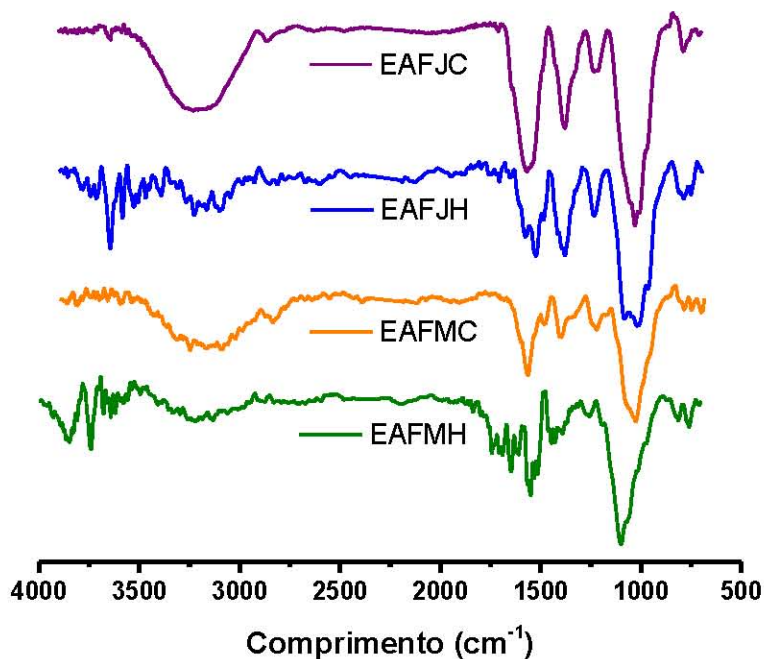
5.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

No FTIR das folhas tratadas foram encontradas algumas bandas de absorção comuns, como a banda larga de 3.493-3.332 cm^{-1} (Figura 4), que indica deformação axial de ligações hidroxila (O-H), de álcoois aromáticos e alifáticos, presentes nas estruturas de celulose e lignina (CARVALHO, 2011; FERNANDES et al., 2011; FERNANDES, 2011; PEREIRA, 2017), indicando também o aumento da hidrofiliabilidade da folha pela exposição desses grupos (PEREIRA et al., 2014).

Essas bandas são pouco evidenciadas nas extrações aquosas, com exceção do extrato aquoso das folhas jovens tratadas com clorofórmio (EAFJC), demonstrando a presença de fenóis (KAVITA et al., 2016).

Na análise também foi observada a presença de bandas de 2930 e 2958 cm^{-1} , em todas as extrações alcoólicas (etanólicas e metanólicas) (Figura 5 e 6). Entretanto, essas bandas não foram registradas nas extrações aquosas (Figura 4) e pouco evidenciadas no extrato metanólico de folhas maduras tratadas com clorofórmio (EMFMC) (Figura 5).

Figura 4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração aquosa das folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.



Fonte: autoria própria (2018).

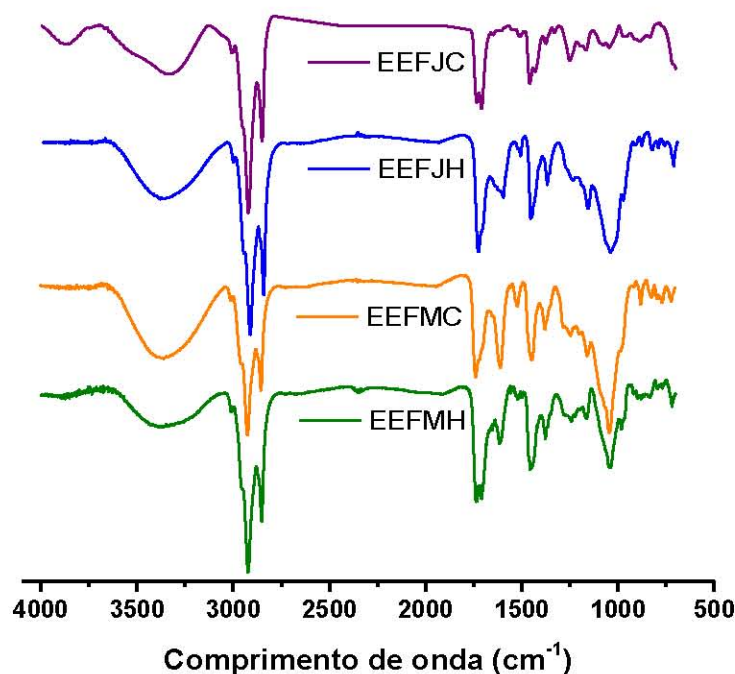
O resultado registrado neste estudo corrobora com o resultado obtido no estudo de Pinto et al. (In prep.), onde essas bandas também não aparecem nos extratos aquosos da cera epicuticular de *C. prunifera* e estão relacionadas a grupos metilênicos e metílicos, presente em materiais lignocelulósicos (de natureza hidrofóbica e com celulose, hemicelulose e lignina, como principais constituintes) (BALAT, 2011, PEREIRA, 2017). A alcalinidade presente nos extratos aquosos interfere no modo de extração desses materiais (MOHANTY, 2005; MARQUES, 2012; PHILIPPINI, 2012). Essas bandas também estão associadas à presença de alcanos, aldeídos, ácidos e carboxilas, componentes que fazem parte da composição natural das ceras cuticulares, além de álcoois, esteroides e hidrocarbonetos (LEIDE et al., 2011; PEREIRA, 2017). Também indicam a presença de terpenos, fenóis e saponinas, caracterizados pelos grupamentos C-H, O-H e C=O, respectivamente (VANAJA e KAVITHA, 2016; OMRAN et al., 2017).

Nas bandas compreendidas entre 1731-1544 cm^{-1} ocorrem vibrações de núcleos aromáticos (C=C), presente nas ligninas e hemicelulose e deformação axial de ligação de ésteres (C = O), comuns em grupos aldeídos, cetonas e carboxilas (YANG et al., 2007; FERNANDES et al., 2010; PEREIRA, 2014). É possível observar que a banda de 1600 cm^{-1} , compreendida dentro da faixa espectral citada, está presente em todas as extrações, com exceção do extrato etanólico de folhas jovens tratadas com clorofórmio (Figura 5). Essas bandas também indicam a presença de saponinas (KAVITA et al., 2016).

As bandas de absorção observadas em todos os espectros e compreendidas entre 1650-1515 cm^{-1} , por sua vez, indicam deformação angular de amidas (C-H e de N-H), indicando a presença de proteínas (VIMALA et al., 2014; JEMAL et al., 2017).

Entre as bandas de 1450-1405 cm^{-1} ocorre deformação angular de C-H de anéis piranos presentes na estrutura da hemicelulose e deformação axial de ácidos carboxílicos. A banda de 1045 cm^{-1} não aparece no extrato etanólico de folhas jovens tratadas com clorofórmio (EEFJC), enquanto em folhas tratadas com hexano (EEFJH e EEFMC) essa banda aparece em menor evidência (Figura 5).

Figura 5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração etanólica das folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.

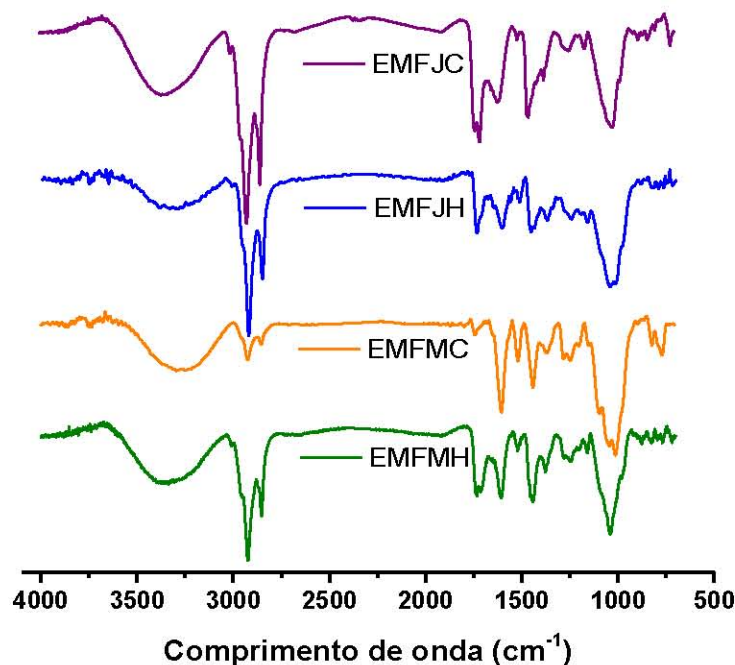


Fonte: autoria própria (2018).

As bandas de 1264-1245 cm^{-1} , por sua vez, correspondem à deformação axial angular de C-C-C do grupo C-C (=O) das cetonas. As bandas entre 1095-1032 cm^{-1} , indicam presença de carbonilas (C=O) de compostos naturais orgânicos dos extratos. As bandas compreendidas entre 1200-1000 cm^{-1} , também indicam forte presença de álcoois e fenóis, caracterizadas por vibrações de deformação axial de O-H e C-O (VIMALA et al., 2014, VANAJA; KAVITHA, 2016). Além disso, indicam a presença de éteres (C=O) e ésteres (C-O) aromáticos.

As bandas de 833 a 782 cm^{-1} correspondem à deformação angular simétrica fora do plano de N-H de amidas primárias e secundárias, reforçando a presença de proteínas.

Figura 6. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), de extração metanólica das folhas jovens e maduras de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.



Fonte: autoria própria (2018).

5.3.5 Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS•+

Os resultados da análise de atividade antioxidante pelo método ABTS mostrou que as folhas maduras de *C. prunifera* apresentaram AA melhor do que as folhas jovens, independentemente do tratamento utilizado. E comparando a atividade antioxidante das folhas jovens tratadas com clorofórmio com as tratadas com hexano, as tratadas com hexano tiveram atividade antioxidante maior. Já em relação as folhas maduras, as tratadas com clorofórmio tiveram AA melhor (Tabela 3). Ao que parece o tratamento químico utilizado exerce papel importante na determinação da AA dos extratos das folhas.

A capacidade antioxidante dos extratos está relacionada à presença de compostos fenólicos em sua composição, cuja atividade depende do número e da posição dos substituintes no anel aromático (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ. 2004).

A distribuição dos constituintes nas ceras varia com os estágios de crescimento e das condições ambientais da espécie, como por exemplo, temperatura e índice pluviométrico (WEN et al., 2006; FREITAS, 2011).

Tabela 3. Atividade antioxidante pelo método ABTS de diferentes extrações de folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.

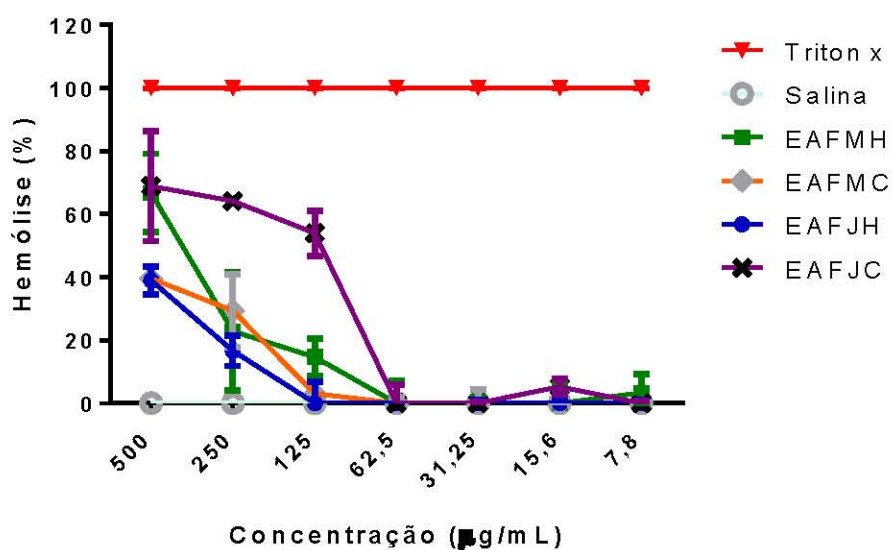
	Extratos	ABTS ug VEAC/mg extrato ± DP
Clorofórmio	EAFJC	167,05 ± 17,8
	EEFJC	22,7 ± 0,0
	EMFJC	96,20 ± 3,3
	EAFMC	218,83 ± 1,5
	EEFMC	221,85 ± 0,63
	EMFMC	220,34 ± 2,05
Hexano	EAFJH	187,92 ± 6,6
	EEFJH	132,11 ± 5,9
	EMFJH	216,8 ± 1,9
	EAFMH	217,43 ± 3,2
	EEFMH	202,22 ± 0,93
	EMFMH	214,89 ± 2,8

Folhas jovens tratadas com clorofórmio/hexano: – extrato aquoso (EAFJC/EAFJH); extrato etanólico (EEFJC/EEJH); extrato metanólico (EMFJC/EMFJH). Folhas maduras tratadas com clorofórmio/hexano: - extrato aquoso (EAFMC/EAFMH); extrato etanólico (EEFMC/EEFMH); extrato metanólico (EMFMC/EMFMH). Fonte: autoria própria (2018).

5.3.6 Atividade Hemolítica

Os resultados mostraram que, com exceção do EAFJC, os extratos aquosos apresentaram menos de 40% de atividade hemolítica na concentração de 250 µg/mL e atividade hemolítica menor que 20% na concentração de 125 µg/mL, e ausência de hemólise nas concentrações iguais ou menores que 62,5 µg/mL. As extrações aquosas apresentaram atividade hemolítica ≤ 70 % na maior concentração, 500 µg/mL (Figura 7).

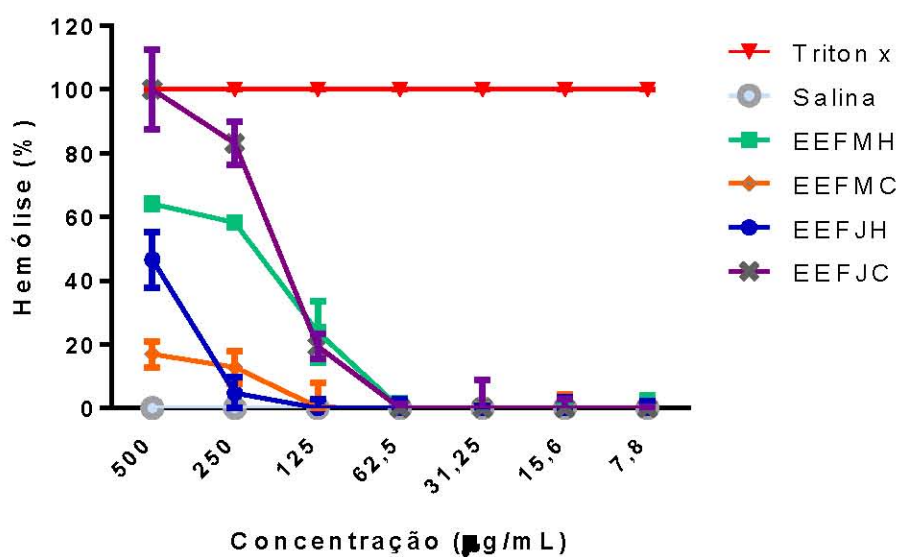
Figura 7. Atividade hemolítica de extrações aquosas de folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.



Fonte: autoria própria (2018).

Em relação a atividade hemolítica das extrações etanólicas, o EEFMC e EEFJH apresentaram menos de 10% e 0% de citotoxicidade para eritrócitos nas concentrações ≥ 250 $\mu\text{g/mL}$ e ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os extratos EEFJC e EEFMH apresentaram ausência de citotoxicidade para eritrócitos nas concentrações $\leq 62,5$ $\mu\text{g/mL}$, sendo menos biocompatíveis que os anteriores (Figura 8).

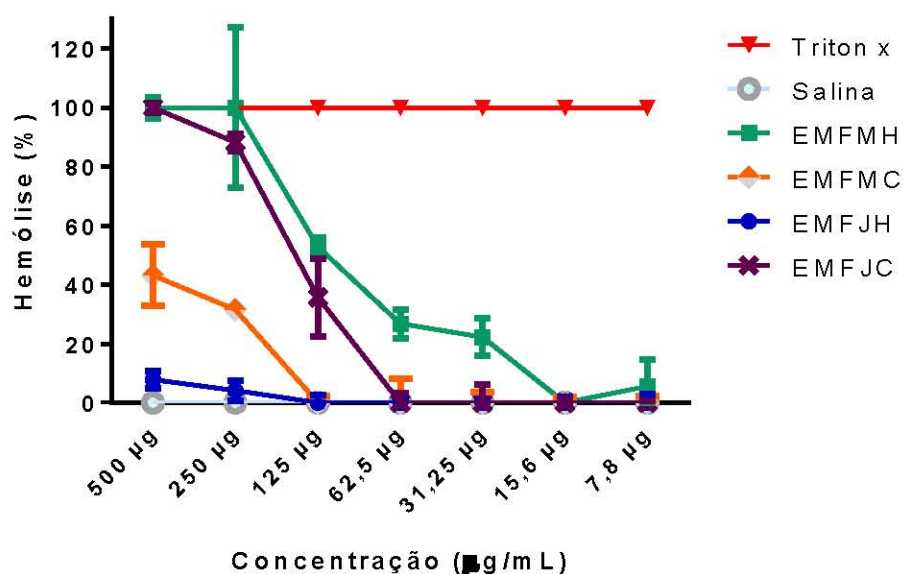
Figura 8. Atividade hemolítica de extrações etanólicas de folhas de *C. prunifera* (Mill.) H.E. Moore tratadas com clorofórmio e hexano



Fonte: autoria própria (2018).

No que se refere aos extratos metanólicos, não foi observada toxicidade nas concentrações testadas para o EMFJH. Entretanto, para EMFMC, EMFJC e EMFMH apresentaram atividade hemolítica nas concentrações $\leq 125 \mu\text{g/mL}$, $\leq 62,5 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 15,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 9).

Figura 9. Atividade hemolítica de extrações metanólicas de folhas de *C. prunifera* (Mill.) HE Moore tratadas com clorofórmio e hexano.



Fonte: autoria própria (2018).

Dentre todos os extratos, os que demonstram menor e maior biocompatibilidade foram os extratos EMFMH (52% de hemólise) e EMFJC (0% de hemólise) na concentração de $\leq 125 \mu\text{g/mL}$ e $\leq 500 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Neste trabalho foi verificado que as atividades hemolíticas de todos os extratos foram dependentes da concentração.

5.4 CONCLUSÃO

Os resultados da SEM demonstraram que os solventes utilizados foram eficazes na remoção da camada cerifera da superfície e, que estes promoveram mudanças estruturais pouco expressivas nas folhas. O rendimento dos extratos de folhas maduras tratadas com clorofórmio foi melhor em relação aos extratos das folhas maduras tratadas com hexano. Enquanto o rendimento dos extratos de folhas jovens tratadas com hexano foi melhor do que os extratos de folhas jovens tratadas com clorofórmio. Os testes fitoquímicos qualitativos indicaram a presença de taninos condensados e açúcares redutores em todos os extratos, com exceção do extrato etanólico das folhas jovens tratadas com clorofórmio (EEFJC) e hexano (EEFJH), onde não foram detectados saponinas.

Todas as extrações de folhas tratadas com hexano apresentaram maior número de bandas de absorção de grupamentos químicos quando comparados com o tratamento com clorofórmio. A identificação dos principais grupamentos no FT-IR sugere que os principais constituintes destes extratos foram compostos que apresentaram grupos aldeídos, ésteres, éteres e anéis aromáticos, além de fenóis, terpenos e saponinas, estes últimos, confirmados nos resultados obtidos na análise fitoquímica.

O presente estudo mostrou que os extratos de folhas de *C. prunifera* apresentam diferentes indicadores de toxicidade que devem ser levados em consideração para formulações desses extratos.

5.5 REFERÊNCIAS

- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista científica da UFPA**, v. 4, n. 5, p. 1-19, 2004.
- BEZERRA, K. C. B. **Características físicas e físico-químicas do fruto da carnaúba (*Copernicia prunifera* H. E. MOORE)**. 2013. 42 f. Dissertação de mestrado (Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí.
- CARVALHO, L. F. M. **Tratamentos de fibras de carnaúba [*Copernicia prunifera* (Miller) HE Moore] para o desenvolvimento de compósito biodegradável com matriz de polihidroxibutirato**. 2011. 109 f. Tese de doutorado (Engenharia dos materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- CAVALCANTI, S. L. D. L. **Caracterização do óleo de carnaúba para uso como biolubrificante**. 2014. 77f. Dissertação de mestrado (Engenharia Mecânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- FERNANDES, J. E. D. A. **Uso da palha de carnaúba em revestimento de dutos**. 2011. 102 f. Dissertação de mestrado (Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- FERNANDES, J. E., DANTAS, T. N. D. C., FONSECA, J. L. C., PEREIRA, M. R. . Carnauba straw: Characterization and chemical treatments. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, n. 3, p. 1614-1621, 2011.

FREITAS, M. M. M. **Obtenção de álcoois de cadeia longa a partir da cera de carnaúba**. 2011. 69 f. Dissertação de mestrado (Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará.

FIDALGO, O.; BONINI, V. L. R. (Ed.). **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. Secretaria do Meio Ambiente, 1989.

GIÃO, M. S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; PEREIRA, C. I.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Infusions of portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2638-2647, 2007.

GOMES, J. M. A. N., W. L. . Visão sistêmica da cadeia produtiva da carnaúba. In: GOMES, J. M. A.; SANTOS, KARLA, B.; SILVA, M. S. (Orgs). **EDUFPI**: 190 p. 2006.

GUIMARÃES, W. G.; CAVALCANTE, J. F. M.; QUEIROZ, Z. F.; CASTRO, R. R.; NASCIMENTO, R. F. Extraction and characterization of fatty acids in carnaúba seed oil. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 246-250, 2014.

JEMAL, K.; SANDEEP, B.; POLA, S. Synthesis, characterization, and evaluation of the antibacterial activity of *Allophylus serratus* leaf and leaf derived callus extracts mediated silver nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

KAO, T. H.; CHEN, B. H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7544-7555, 2006.

LEIDE, J.; HILDEBRANDT, U.; VOGG, G.; RIEDERER, M. The positional sterile (ps) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 9, p. 871-877, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, 2004, 416p.

MARANI, M. M.; DOURADO, F.S.; QUELEMES, P.V.; DE ARAÚJO, A. R.; PERFEITO, M.L.G.; BARBOSA, E.A.; VÉRAS, L.M.; COELHO, A. L. R.; ANDRADE, E.B.; EATON, P.; LONG, J. P. F.; AZEVEDO, R.B.; DELERUE-MATOS, C.; LEITE, J.R.S.A. Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of Natural Products**, v.78, n 7, p. 1495-1504, 2015.

MARQUES, J. S. **Uso do pó da palha de carnaúba em compósitos de quitosana**. 2012. 74f. Dissertação de mestrado (Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MATOS, F, J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3 ed. Fortaleza, UFC, 2009

MESQUITA, R. C. M. **Seleção de genótipos superiores de carnaubeira (*Copernicia* sp).** Formulário de projeto de pesquisa apresentado ao FUNDECI-ETENE-BNB Fortaleza-CE 2005.

MIRANDA, J. A. L.; ROCHA, J. A.; ARAÚJO, K. M.; QUELEMES, P. V.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1142–1149, 2015.

MOHANTY, A. K. M., M.; DRZAL, L.T; SELKE, S.E; HARTE, B.R; HINRICHSEN, G. **Natural Fibers, Biopolimers and Biocomposites**. Boca Raton: 2005. 888.

MOTA, W. F.; SALOMÃO, L.C.C.; NERES.C.R.L. MIZOBTEI,G.P.; NEVES, L.L.M. Uso de cera de carnaúba e saco plástico poliolefinico na conservação pós-colheita do maracujá-amarelo1 **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 190-193, Agosto 2006

NOGUEIRA, D. H. **Qualidade e potencial de utilização de frutos de genótipos de carnaubeira (*Copernicia prunifera*) oriundos do estado do Ceará.** 2009. 111f. Tese de doutorado (Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba.

OLIVEIRA, A. F. M.; MEIRELLES, S. T.; SALATINO, A. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p. 431-439, 2003.

OMRAN, R.; AL-TAEE, Z. M.; HASHIM, H. O.; AL-JASSANI, M. J. Preventive effects of *Phoenix dactylifera* polyphenols against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary cancer. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 7, p. 172-181, 2017.

PAREKH, J.; JADEJA, D.; CHANDA, S. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, n. 4, p. 203-210, 2006.

PEREIRA, J. E. S. **Biossorção de cobre em solução aquosa utilizando os pós das folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e da carnaúba (*Copernicia prunifera*).** 2017. 89f. Dissertação de mestrado (Engenharia Química) - Universidade Federal do rio Grande do Norte.

PEREIRA, M. R.; MARQUES, J. S.; FONSECA, J. L. C. Biocomposites based on chitosan and carnauba straw powder. **Polímeros**, v. 24, p. 446-452, 2014.

PESSUTO, M. B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante.** 2006. 105f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá.

PHILIPPINI, R. R.. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento**

difrenciadas. 2012. 82f. Dissertação de mestrado (Ciências). Universidade de São Paulo.

RAZEQ, F. M.; KOSMA, D. K.; ROWLAND, O.; MOLINA, I. Extracellular lipids of *Camelina sativa*: characterization of chloroform-extractable waxes from aerial and subterranean surfaces. **Phytochemistry**, v. 106, p. 188-196, 2014.

RUFINO, M. U. L.; COSTA, J. T. M.; SILVA, V. A.; ANDRADE, L. H. C. Knowledge and use of ouricuri (*Syagrus coronata*) and babaçu (*Orbignya phalerata*) in Buíque, Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.
STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., TOLEDO, M. V., PORTZ, R. L., PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, C. H. A.; FERNANDES, C. C. L.; COSTA, M. V. O.; SILVA, F. F. M.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (*Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 11, p. 353-361, 2017.

SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; ROCHA, T. G. F.; SANTANA, J. A. S.; VIEIRA, F. A. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira carnaúba no semiárido brasileiro. **Cerne**, v. 21, n. 4, 2015.

VANAJA, D.; KAVITHA, S. A study on phytochemicals, antioxidant activity and ft-ir analysis of *Rhapis excelsa* (Thunb.) a. henry. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, p. 5, 2016.

VIEIRA, I. R.; OLIVEIRA, J. S. D.; LOIOLA, M. I. B. Effects of harvesting on leaf production and reproductive performance of *Copernicia prunifera* (Mill.) HE Moore. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 117-123, 2016.

VIMALA, K.; SUNDARRAJ, S.; PAULPANDI, M.; VENGATESAN, S.; KANNAN, S. Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bel-2 expression in breast and colon carcinoma. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 160-172, 2014.

YANG, H., YAN, R., CHEN, H., LEE, D. H., ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

WEN, M.; BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Nanotubules on plant surfaces: Chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. **Phytochemistry**, v. 67, n. 16, p. 1808-1817, 2006.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes fitoquímicos qualitativos indicaram a presença de taninos, saponinas e açúcares redutores nas duas amostras de extratos aquosos do pó cerífero, sendo que

apenas no EAFJ foi detectado a presença de alcaloide, enquanto no EAFM foi a presença de flavonóis.

Os dados de FTIR sugere que os principais constituintes de EAFJ e EAFM foram compostos que apresentaram grupos aldeídos, ésteres, éteres e anéis aromáticos, confirmados nos resultados obtidos na análise fitoquímica e eletroquímica do extrato, os quais evidenciaram a presença de saponinas, fenóis e flavonóides.

Os extratos da cera epicuticular apresentaram concentrações consideráveis de compostos fenólicos, que provavelmente estão envolvidos nas atividades biológicas dos extratos, assim como as outras classes detectadas qualitativamente no estudo do capítulo 1.

O EAFJ apresentou atividade antioxidante na concentração de $56,48 \pm 21,91$ mg EAG/ g de extrato e, o EAFM $158,52 \pm 39,27$ mg EAG/ g de extrato.

Todos os extratos da cera epicuticular apresentaram atividade citotóxica contra as quatro linhagens tumorais testadas, sendo mais citotóxicos para a linhagem de glioblastoma (SF-295), embora o EAFM foi mais seletivo.

O teste de hemólise de eritrócitos mostrou que os extratos de cera apresentaram baixa atividade hemolítica, não sendo tóxicos nas concentrações que apresentaram atividade biológica, sugerindo que a cera epicuticular apresenta grande potencial como busca alternativa para a pesquisa no tratamento de neoplasias.

Os resultados da SEM demonstrou que os solventes utilizados foram eficazes na remoção da camada cerífera da superfície e, que estes promoveram mudanças estruturais pouco expressivas nas folhas.

O rendimento dos extratos metanólicos de folhas tratadas com clorofórmio foi de 2,9% e 9,1%, para EMFJC e EMFMC, respectivamente; para os extratos aquosos, o rendimento foi de 3,9% e 10,1%, para EAFJC e EAFMC, respectivamente; e para os extratos etanólicos foi de 0,9% e 5,4% para EEFJC e EEFMC, respectivamente.

Já o rendimento dos extratos metanólicos de folhas tratadas com hexano foi de 6,8% para EMFJH e 8,3% para EMFMH; nos extratos aquosos o rendimento foi de 3,4% e 7,7% para EAFJH e EAFMH, respectivamente; para os extratos etanólicos o rendimento foi de 2,7% e 2,8% para EEFJH e EEFMH, respectivamente.

Os testes fitoquímicos qualitativos dos extratos das folhas tratadas indicaram a presença de taninos condensados e açúcares redutores em todos os extratos, com

exceção do extrato etanólico das folhas jovens tratadas com clorofórmio (EEFJC) e hexano (EEFJH), onde não foram detectados saponinas.

A identificação dos principais grupamentos no FTIR sugere que os principais constituintes dos extratos foliares do capítulo 2, são compostos que apresentam grupos aldeídos, ésteres, éteres e anéis aromáticos, além de fenóis, terpenos e saponinas, estes últimos, confirmados nos resultados obtidos na análise fitoquímica.

As extrações (aquosa, etanólica e metanólica) de folhas maduras tratadas com clorofórmio tiveram atividade antioxidante maior quando comparadas com folhas maduras tratadas com hexano. No entanto as folhas jovens tratadas com hexano apresentaram atividade antioxidante mais eficiente do que as folhas jovens tratadas com clorofórmio.

O presente estudo mostrou que os extratos de cera epicuticular e folhas de *C. prunifera* apresentam potencial biológico, e que estes devem ser levados em consideração para a busca e isolamentos de compostos bioativos.